

Molekularbiologische Charakterisierung der Forisome

Inaugural-Dissertation

**zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaftlichen Fakultät,
Fachbereich Biologie, Chemie und
Geowissenschaften
der Justus-Liebig-Universität Gießen**

vorgelegt von

Gundula A. Noll

Gießen, 2005

D 26

Abkürzungsverzeichnis.....	1
1. Einleitung.....	2
1.1. Der Siebelement-Geleitzellen-Komplex.....	2
1.2. P-Proteine.....	4
1.3. Kristalline P-Proteine.....	5
1.4. Forisome.....	6
1.5. Spasmoneme.....	9
1.5.1. Spasmin.....	10
1.6. Kalzium-Bindungs-Motive.....	11
1.6.1. EF-Hand.....	11
1.6.2. Annexine.....	11
1.6.3. C2-Domäne.....	12
1.6.4. Lektine.....	12
1.7. Ziele der Arbeit.....	13
2. Material und Methoden.....	14
2.1. Material.....	14
2.1.1. Pflanzenmaterial.....	14
2.1.2. Bakterienstämme und Vektoren.....	14
2.1.2.1. Bakterienstämme.....	14
2.1.2.2. Vektoren.....	15
2.1.3. Chemikalien und Verbrauchsmaterial.....	17
2.1.4. Geräte, Apparaturen und Zubehör.....	18
2.2. Methoden.....	19
2.2.1. Aufreinigung der Forisome mittels Dichtegradientenzentrifugation.....	19
2.2.1.1. Vorreinigung des Phloems.....	19
2.2.1.2. Freisetzung und Anreicherung der Forisome.....	19
2.2.1.3. Präparation des Nycodenz®-Gradienten.....	20
2.2.2. Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	20
2.2.3. Zweidimensionale SDS-PAGE.....	21
2.2.4. <i>Genome Walking</i>	22
2.2.5. Sequenzanalyse der Peptide und DNA-Fragmente.....	23
2.2.6. Rekombinante Protein-Expression in <i>E. coli</i>	23

2.2.6.1. Aufreinigung der GST-Fusionsproteine mittels Affinitätschromatographie.....	24
2.2.7. Western-Blot-Analyse.....	24
2.2.8. Immunologischer Nachweis nativer Forisome mittels CLSM.....	25
2.2.9. Promotoranalysen.....	25
2.2.9.1. Transiente Expression in Protoplasten.....	26
2.2.9.2. Expressionsstudien in transgenen Pflanzen.....	27
2.2.10. Standardmethoden.....	28
3. Ergebnisse.....	29
3.1. Molekulare Charakterisierung der Forisomen-Gene.....	30
3.1.1. Gelelektrophoretische Auftrennung der <i>V. faba</i> – Forisome.....	30
3.1.2. Klonierung der Forisomen-Gene.....	32
3.1.2.1. Bestimmung von Peptidsequenzen mittels direkter und massenspektrometrischer Sequenzanalyse.....	32
3.1.2.2. PCR unter Verwendung degenerierter Oligonukleotide	32
3.1.2.3. Datenbanksuche.....	33
3.1.3. Charakterisierung der Forisomen-Gene aus <i>M. truncatula</i>	34
3.1.4. Ca ²⁺ -induzierte Auftrennung der <i>V. faba</i> -Forisome mittels SDS-PAGE.....	39
3.1.5. Auftrennung der <i>C. gladiata</i> -Forisome in ihre Untereinheiten.....	41
3.2. Expression der Forisomen-Gene <i>mfor_1</i>, <i>mfor_2</i> und <i>mfor_3</i> in <i>E. coli</i>.....	44
3.3. Immunologischer Nachweis rekombinanter und nativer Forisomen- Untereinheiten mittels Western-Blot-Analyse.....	45
3.4. Immunologischer Nachweis nativer Forisome mittels CLSM.....	51
3.5. Promotoranalyse.....	54
3.5.1. Transiente Expression der Promotor-GUS-Konstrukte in Protoplasten.....	54
3.5.2. Herstellung transgener Pflanzen.....	55
4. Diskussion.....	59
4.1. Die Untereinheiten der Forisomen.....	59
4.2. Die Klonierung der Forisomen-Gene <i>mfor_1</i>, <i>mfor_2</i> und <i>mfor_3</i>.....	61
4.3. Die Analyse der Forisomen-Gene <i>mfor_1</i>, <i>mfor_2</i> und <i>mfor_3</i>.....	63
4.4. Rekombinante Herstellung der Forisomen-Untereinheiten und immunologischer Nachweis ihrer Beteiligung am Aufbau der Forisome.....	66
4.5. Die Promotoren der Forisomen-Gene.....	72
4.6. Die Kalzium-Reaktion der Forisome – ein mögliches Modell.....	75
5. Zusammenfassung.....	81
6. Literaturverzeichnis.....	83

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AK	Antikörper
ATP	Adenosintriphosphat
Abb.	Abbildung
bp	Basenpaare
CLSM	Konfokale Laser Scanning-Mikroskopie
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSRed	<i>Discosoma</i> -Rot
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EDTA	Ethylendiaminetetraessigsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
GUS	β -Glukuronidase
GSP	Genspezifischer Primer
GST	Glutathion-S-Transferase
GFP	Grün-fluoreszierendes Protein
h	Stunde
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
M	Molar
min	Minute
OD	optische Dichte
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PEG	Polyethylenglykol
rpm	Umdrehungen pro Minute
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SE	Siebelemente
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SER	Siebelementretikulum
YFP	Gelb-fluoreszierendes Protein

1.1. DER SIEBELEMENT-GELEITZELLEN-KOMPLEX

Zwei an ihre jeweilige Funktion perfekt angepasste, netzwerkartige Röhrensysteme bilden die Leitgewebe der dikotylen Angiospermen. Der apoplastische, unidirektionale Transport von Wasser und anorganischen Nährstoffen erfolgt in den toten, lignifizierten, endständig aneinandergereihten Tracheen und Tracheiden des Xylems. Die aus den stark differenzierten, ebenfalls longitudinal verbundenen Siebelementen (SE) aufgebauten Siebröhren des Phloems (Behnke und Sjolund, 1990) gewährleisten den symplasmatischen Photoassimilattransport von den *source*- zu den *sink*-Gewebe der Pflanze. Nach der erstmaligen Beschreibung der SE durch Hartig (1837) rückte der typische Siebelement/Geleitzellen-Komplex des Phloems, der durch die inäquale Teilung einer gemeinsamen Mutterzelle entsteht (Esau, 1969), in den Mittelpunkt zahlreicher Untersuchungen.

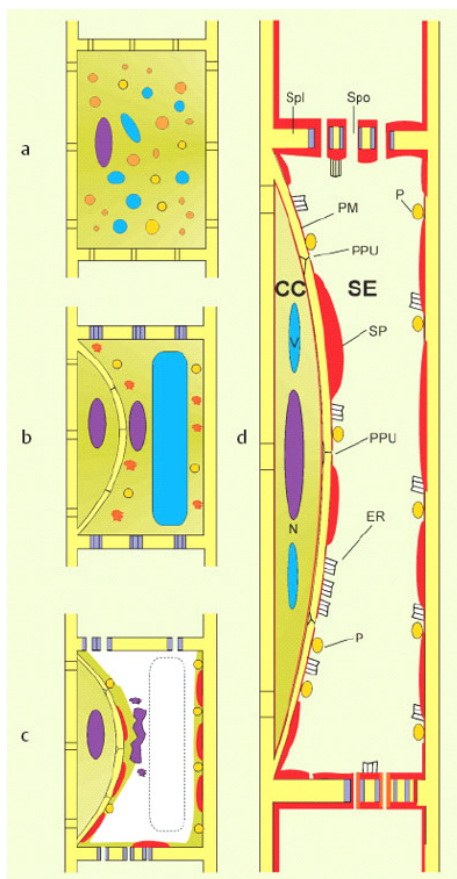


Abb. 1: Schematische Darstellung der Entwicklung des Siebelement/Geleitzellen-Komplexes

(aus van Bel und Hess, 2003)

- a) meristematische Zelle mit dichtem Zytoplasma
 - b) inäquale Teilung der gemeinsamen Mutterzelle
 - c) selektive Autolyse des Siebelements, Auflösung von Tonoplast, Kern, Diktyosomen, Ribosomen, Mikrobodies und Zytoskelett
 - d) ausdifferenziertes Siebelement (SE) mit Plasmamembran (PM), Siebplatten (Spl), Siebporen (Spo), spezialisierten Plasmodesmen (PPU) und dazugehörige Geleitzelle (CC)
- Weitere Komponenten sind farblich dargestellt:

- SP, strukturelle P-Proteine
- P, SE-Plastiden
- ER, Endoplasmatisches Retikulum
- V, Vakuole
- N, Nukleus (Zellkern)

Die Geleitzelle zeichnet sich vor allem durch ein dichtes, physiologisch hoch aktives Zytoplasma und einen großen, meist polyploiden Kern aus, während das Siebelement im Laufe seiner Ausdifferenzierung eine selektive Autolyse durchläuft. Deren Verlauf ist durch

den Verlust des Tonoplasten, der Membran zwischen Vakuole und Zytoplasma, der Auflösung von Zellkern, Diktyosomen, Ribosomen, Mikrobodies sowie der Mikrotubuli und Mikrofilamente gekennzeichnet (Abb. 1). Die Plasmodesmen der transversalen Wände der SE werden zu Siebporen erweitert, die Wände selbst zu so genannten Siebplatten umgebildet. Das dadurch gewährleistete zytoplasmatische Kontinuum und die in ausdifferenzierten SE immer noch vorhandene Plasmamembran ermöglichen den druckgetriebenen Massenfluss der Photoassimilate (Münch, 1930).

Spezialisierte Plasmodesmen der lateralen Wände, die *pore-plasmodesma units* (PPUs; van Bel und Kempers, 1996) mit einer Ausschlussgrenze für Moleküle von mindestens 40 kDa (Kempers and van Bel, 1997), sind auf Seiten der Geleitzelle stark verzweigt, während sie auf Seiten der SE einen breiten Kanal bilden (Esau und Thorsch, 1985). Die PPU's bilden ein Kontinuum der Plasmamembran von SE und Geleitzelle und verbinden so das Zytoplasma der Geleitzelle mit dem SE-Inhalt. Vermutlich steht über die PPU's auch das ER der Geleitzelle mit dem *sieve element reticulum* (SER; Sjolund und Shih, 1983) in Kontakt. Dieses entsteht bei der Ausdifferenzierung der SE und ist durch die Bildung wandständiger (parietaler) Stapel von ER-Zisternen gekennzeichnet. Sowohl die PPU's als auch das SER gewährleisten möglicherweise den Proteintransport von der Geleitzelle ins Siebelement (Fisher *et al.*, 1992; Imlau *et al.*, 1999). Dies ist notwendig, da die Geleitzelle im Laufe der Ausdifferenzierung des Siebelement-Geleitzellen-Komplexes, einhergehend mit dem Verlust von Zellkern und Ribosomen des Siebelements, dessen Proteinbiosynthese übernimmt (Thompson, 1999).

Neben strukturell degeneriert erscheinenden Mitochondrien, die möglicherweise aufgrund der nachgewiesenen Aktivität von Zytochromoxidasen (Catesson, 1980), Säurephosphatasen (Esau und Charvat, 1975) und Nukleosidphosphatasen (Gilder und Crownshaw, 1973) noch funktionell sind, enthalten die ausdifferenzierten SE parietal angeordnete Plastiden, auch als Siebelement-Plastiden bezeichnet, deren Funktion bis heute noch unklar ist. Die verbleibenden Organellen des SE – SER, Mitochondrien und die Plastiden – sind stets peripher angeordnet, da sie mit sieben nm langen und vier nm breiten, klammerartigen Strukturen sowohl untereinander verbunden als auch in der Plasmamembran verankert sind (Ehlers *et al.*, 2000).

Behnke (1981, 1991) nutzte die für die jeweiligen Pflanzenfamilien charakteristischen Inhaltsstoffe der SE-Plastiden als Klassifizierungsmerkmal. Plastiden des S-Typs enthalten ausschließlich Stärke, während die P-Typ-Plastiden sowohl Stärke als auch Protein beinhalten. Zusätzlich wird zwischen Pfs- (mit Protein-Filamenten und Stärke) und Pcs-Plastiden (die einen kristallinen Proteinkörper und Stärke enthalten) differenziert (Behnke *et*

al., 1996). Beobachtungen mit Hilfe der *confocal laser scanning microscopy* (CLSM) legen nahe, dass die SE-Plastiden eventuell für den Wundverschluss des Siebelements verantwortlich sind, da sie aufgrund des mit einer Verletzung einhergehenden Druckabfalls im SE platzen. Der Plastideninhalt wird mittels des Translokationsstroms auf der Siebplatte abgelagert und verstopft in Folge dessen die Siebporen (Knoblauch und van Bel, 1998). Es könnte sich hierbei allerdings auch um einen sekundären Effekt handeln, da nach Verwundung durch Bestrahlung der Zellen mit Laserlicht zwar ein Verschluss der Siebporen, jedoch kein Ablösen und Platzen der SE-Plastiden beobachtet werden konnte (Knoblauch, 2000).

1.2.

P-PROTEINE

Die 150-200 phloemspezifischen Proteine, die im Siebelementsaft nach Exudation gefunden wurden, werden als *sieve tube exudate proteins* (STEPS; Schobert *et al.*, 1995) bezeichnet. Den Hauptanteil bilden lösliche Proteine (Fisher *et al.*, 1992) mit Molekulargewichten zwischen 20 und 60 kDa (Sjolund, 1997). In einigen Fällen gelang deren Aufreinigung und Isolierung, beispielsweise für Ubiquitin und Chaperone aus *Ricinus*, woraufhin vermutet wurde, dass ein Teil der STEPS in den Proteinumsatz des Siebelements involviert ist (Schobert *et al.*, 1995). Nach Zugabe von ³⁵S Cystein/Methionin konnte mittels Mikro-Autoradiographie deren Bildung in der Geleitzelle lokalisiert (Fisher *et al.*, 1992) sowie die anschließende Passage in das SE und ihr Transport im Phloemstrom nachgewiesen werden. Ishiwatarie *et al.* (1995) gelang die Identifizierung der Disulfidreduktase Thioredoxin h als Hauptprotein im Phloemsaft von *Oryza*, die vermutlich als Reparaturenzym für wichtige Proteine des Siebelements fungiert, deren Nachlieferung aus der Geleitzelle zu zeitaufwändig wäre (Raven, 1991).

Proteine geplatzter SE-Plastiden und Teile von Strukturproteinen sind weitere Bestandteile der STEPS. Die für die dikotylen Angiospermen typischen, im SE-Lumen lokalisierten strukturellen Proteine (P-Proteine), deren Funktion vermutlich der Wundverschluss der SE ist (Esau, 1969; Knoblauch und van Bel, 1998), wurden auch für monokotyle Genera wie *Avena*, *Dioscorea*, *Elodea* sowie einzelne Palmen-Spezies beschrieben (Crownshaw, 1975).

Die Struktur dieser P-Proteine variiert artspezifisch von granulär über filamentös/fibrillär und tubulär bis hin zu kristallin und ist vermutlich auch abhängig vom Entwicklungsstadium des jeweiligen SE (Wergin und Newcomb, 1970; Parthasarathy, 1975). Tubuläre und fibrilläre P-Proteine wurden auch im Kern sich ausdifferenzierender SE gefunden (Evert und Deshpande, 1970).

Elektronenmikroskopische Aufnahmen von SE in sehr frühen Entwicklungsstadien zeigen Ansammlungen granulären Materials und erster Filamente in unmittelbarer Nähe zu freien Ribosomen, dem ER, Diktyosomen, Mikrotubuli und *coated* Vesikeln. Es wird vermutet, dass diese Filamente die Vorläufer für die häufig beobachteten tubulären P-Proteine darstellen (Esau, 1971), deren Durchmesser sowohl zwischen den Arten (Zee, 1969) als auch innerhalb einer einzelnen Pflanze (Parthasarathy und Mühlethaler, 1969) im Bereich von 10-30 nm variieren kann. Eine höhere Ordnungsstruktur wurde als Akkumulation dieser Tubuli zu durch „Seitenarme“ quervernetzten Bündeln ebenfalls beschrieben (Lawton und Newman, 1979; Sabnis und Hart, 1973; Arsanto, 1982).

Sowohl fibrilläre als auch granuläre P-Proteine wurden jedoch ebenso in späteren Entwicklungsstadien der SE-Differenzierung beobachtet (Hoeffert, 1980), so dass ein hierarchischer Bezug zwischen den einzelnen Formen der P-Proteine bis heute nicht eindeutig nachgewiesen werden konnte. Zudem finden die Beschreibungen granulär, fibrillär, filamentös und tubulär keine einheitliche Verwendung (Sabnis und Sabnis, 1995). In ausdifferenzierten, intakten SE sind die P-Proteine bzw. P-Protein-Akkumulationen wie die bereits beschriebenen SE-Organellen zumeist parietal angeordnet und werden deshalb auch als parietale P-Proteine bezeichnet (Evert, 1990).

Knoblauch und van Bel (1998) konnten mittels CLSM zeigen, dass sich die parietalen P-Proteine nach mechanischer Verletzung oder Verwundung durch Laserlicht von der SE-Wand lösen, mittels des Phloemstroms auf die stromabwärts gelegene Siebplatte verlagert werden und als P-Protein-Pfropfen innerhalb von Sekunden die Siebplatte verstopfen. Das gleiche Phänomen wurde als Präparationsartefakt für die Elektronenmikroskopie beschrieben (Ehlers *et al.*, 2000). Die Funktion des Wundverschlusses verletzter SE durch die parietalen P-Proteine konnte mittels des phloemmobilen Fluoreszenzfarbstoffs CDMFDA (5(6)-Carboxy-4'-5'-Dimethylfluorescein Diacetat) von Knoblauch und van Bel (1998) *in vivo* nachgewiesen werden.

1.3. KRISTALLINE P-PROTEINE

Strasburger berichtete 1891 erstmals von der Beobachtung so genannter Schleimkörper in SE von *Robinia pseudacacia*. Diese für die SE der Fabaceen typischen, stark lichtbrechenden Akkumulationen wurden später durch spezifische Färbung als proteinhaltig identifiziert und ihre Zentralkörper als spindel-, zylinder-, stab- oder zigarrenförmig beschrieben (Mrazek, 1910; Bailey, 1923). Nach elektronenmikroskopischen Studien junger, nicht ausdifferenzierter SE wurden diese bislang ausschließlich für SE der Fabaceen beschriebenen Proteinkörper als

kristalline P-Proteine bezeichnet, resultierend aus ihrer hoch geordneten, elektronendichten, aus parallel angeordneten Fibrillen bestehenden Struktur (Wergin und Newcomb, 1970; Wergin *et al.*, 1975). Die Annahme, dass die Proteinkörper in ausdifferenzierten SE dispergiert vorliegen (Wergin und Newcomb, 1970; Palevitz und Newcomb, 1971) konnte von Fisher (1975) und Lawton (1978b) durch Veränderungen der Fixierungsmethoden widerlegt und als Artefakt der Präparation für die Elektronenmikroskopie erklärt werden.

Im Laufe der letzten Jahre wurde mittels Licht-, Elektronen- und konfokaler Laser Scanning-Mikroskopie gezeigt, dass die kristallinen P-Proteine der Fabaceen in ausdifferenzierten SE als kompakte, meist spindelförmige, in ihrer Struktur hoch geordnete Körper vorkommen.

Einige kristalline P-Proteine weisen charakteristische schwanzartige Fortsätze auf, beispielsweise die der Gattung *Phaseolus* (Esau, 1978), während diese bei anderen fehlen, etwa in SE der Gattungen *Vicia* und *Pisum*. Nach diesem Merkmal erfolgte die Einteilung der kristallinen P-Proteine in zwei Gruppen (Lawton, 1978a).

Während die SE des Metaphloems und des sekundären Phloems aller untersuchten Fabaceen bis zu 30 µm große, kristalline P-Proteinkörper (Lawton, 1978b) aufweisen, konnten diese in SE des Wurzelprotophloems bisher nicht beobachtet werden (Esau und Gill, 1971). Nach Verletzung des SE durchlaufen die Proteine eine Konformationsänderung, in deren Folge sie die stromabwärts gelegene Siebplatte vollständig verschließen und somit den Verlust der Photoassimilate verhindern. Ist das SE in der Lage, sich zu regenerieren, kondensiert der P-Proteinkörper erneut und ermöglicht so die Wiederaufnahme des Translokationsstromes (Knoblauch *et al.*, 2001).

1.4.

FORISOME

Die reversible Konformationsänderung der kristallinen P-Proteinkörper von einem spindelförmigen, kondensierten in einen pfropfartigen, dispergierten Zustand reguliert die Durchlässigkeit der Siebplatten und veranlasste die Autoren daher, diesen Proteinkörpern den Namen Forisome zu geben (lat. *foris*: Türflügel, griech. *soma*: Körper; Knoblauch *et al.*, 2003). Eine transiente Färbung der Proteinkörper, durch Verwendung des Fluoreszenzfarbstoffes CDMFDA, ermöglichte die lichtmikroskopische Beobachtung der dispergierten Forisome *in vivo* (Abb. 2; Knoblauch *et al.*, 2001).

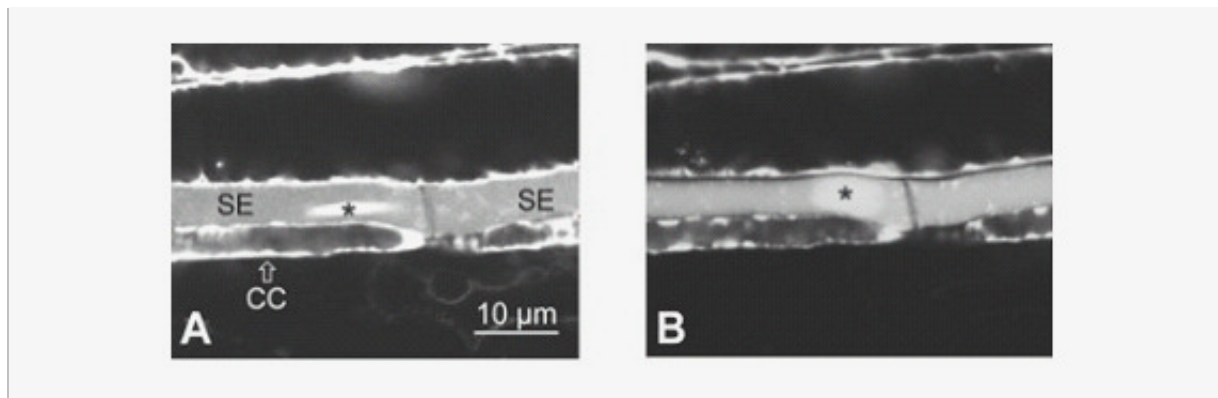


Abb. 2: Wundverschluss der Siebelemente durch Konformationsänderung der Forisome
(aus Knoblauch *et al.*, 2001)

- (A) CLSM-Aufnahme von intakten, transportierenden Siebelement(SE)/Geleitzellen(CC)-Komplexen nach Färbung mit CDMFDA. Das Forisom (durch Stern gekennzeichnet) liegt in seiner kondensierten Konformation vor
- (B) CLSM-Aufnahme nach Verletzung des Siebelementes mit einer Mikroinjektionsnadel. Das Forisom durchläuft eine Konformationsänderung in den dispergierten Zustand

Hieraus wurde ersichtlich, dass die Proteine nicht, wie durch elektronenmikroskopische Aufnahmen impliziert, eine vollständige Auflösung in ungeordnete Fibrillen erfahren, sondern dass auch dispergierte Forisome einen distinkten Körper darstellen. Zahlreiche auf dieser Erkenntnis aufbauende Versuche führten nun schrittweise zur Aufklärung der Ursache der Konformationsänderung und bildeten damit wiederum die Basis für die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen molekularbiologischen Untersuchung der Forisome.

In vivo-Versuche an SE von *Vicia faba*-Pflanzen zeigten zunächst, dass auch andere Faktoren als mechanische Verletzung zu einer Dispersion der Forisome führen können (Knoblauch *et al.*, 2001). Die Konformationsänderung erfolgte innerhalb von 20-30 Sekunden auch nach Zugabe von Detergenzien wie Triton X100, die die Membranpermeabilität erhöhen. Rapide Druckveränderungen durch schrittweise extrazelluläre Verringerung bzw. Erhöhung der Osmolarität führten ebenfalls zu einer Dispersion der Forisome. Eine langsame Veränderung der Osmolarität bis hin zur vollständigen Plasmolyse zeigte jedoch keinen Effekt auf die Proteinkörper, was vermuten ließ, dass nicht der absolute Wert der extrazellulären Osmolarität, sondern die Änderung pro Zeiteinheit die Konformationsänderung der Forisome auslöst. In beiden oben beschriebenen Experimenten erfolgte die Reorganisation der Proteinkörper in den kondensierten Zustand nach wenigen Minuten.

Des Weiteren konnte beobachtet werden, dass die Zugabe von Chelatoren wie EDTA, EGTA und Citrat ins extrazelluläre Medium die Dispersion der Forisome verhindert, sowohl nach mechanischer Verletzung oder Erhöhung der Membranpermeabilität als auch nach rapider Druckveränderung. Dies legt die Beteiligung von Ionen, wie zum Beispiel Ca^{2+} , an der Konformationsänderung der Forisome nahe.

Die Aufrechterhaltung der zytoplasmatischen Ca^{2+} -Konzentration im submikromolaren Bereich (Gilroy *et al.*, 1993) ermöglicht einen Ca^{2+} -Konzentrationsgradienten vom extrazellulären zum intrazellulären Raum des SE, möglicherweise kontrolliert durch spezielle Ca^{2+} -bindende Proteine (Mc Euen *et al.*, 1981), Sezernierung von Kalziumionen ins SER (Arsanto, 1986) sowie Ca^{2+} -ATPasen in der Plasmamembran (Askerlund und Sommarin, 1996). Es wurde angenommen, dass der Influx der Ca^{2+} -Ionen nach Verletzung der Zelle bzw. nach Öffnung spezifischer Ca^{2+} -Kanäle oder -Pumpen ins SE und der damit verbundene Anstieg der Konzentration dieses Triggerions – das Teil zahlreicher Signaltransduktionsketten ist (Poovaiah und Reddy, 1993; Bush, 1995) – mit der Konformationsänderung der Forisome in direktem Zusammenhang steht (Knoblauch *et al.*, 2001).

In vitro-Studien zur Reaktion intakter Proteinkörper auf Veränderungen der Ionenkonzentration wurden möglich, als es gelang, Forisome aus dem SE mit Hilfe einer Mikropipette zu isolieren und anschließend in eine Probenkammer zu überführen (Knoblauch *et al.*, 2003).

Nach Zugabe von Kalziumionen in das die Forisome umgebende Medium erfolgt eine anisotrope Bewegung, verbunden mit einer longitudinalen Verkürzung um 30%, einer Zunahme des Durchmessers um 130% und damit einer dreifachen Volumenzunahme des Proteinkörpers. Die für diese Konformationsänderung der Forisome notwendige Ca^{2+} -Konzentration beträgt ca. 5×10^{-5} M (Knoblauch *et al.*, 2005), wobei der physiologische pH-Wert der SE von 7,3 auch im Versuchsmedium beibehalten wurde. Nach Zugabe der oben beschriebenen Chelatoren ist die Dispersion der Proteinkörper auch *in vitro* reversibel (Knoblauch *et al.*, 2003). Sowohl Kondensation als auch Dispersion, die beide innerhalb von Sekundenbruchteilen erfolgen, lassen sich mehrfach an einem Proteinkörper wiederholen. Andere zweiwertige Kationen wie Ba^{2+} und Sr^{2+} bewirken ebenfalls eine Dispersion der Forisome und lassen sich mit Hilfe von Chelatoren kompetitieren. Allerdings resultiert die Zugabe von Mg^{2+} nicht in einer Konformationsänderung der Proteinkörper, was möglicherweise mit dem *in vivo*-Transport dieses zweiwertigen Kations im SE der Pflanzen in Zusammenhang steht.

Im Hinblick auf das zunehmende Interesse an der bislang nur ansatzweise verstandenen Funktionsweise und Struktur der Forisome stößt man bei der Suche nach Modellbeispielen Ca^{2+} -bindender, ATP-unabhängiger und kontraktile Strukturproteine unweigerlich auf die Spasmoneme peritricher Ciliaten. Die der Familie der *Vorticellideen* angehörenden Arten *Vorticella*, *Archesium* und *Zoothamnium* wurden hinsichtlich ihrer reversibel spasmodisch kontrahierenden Stiele intensiv untersucht (Amos, 1972; Amos, 1975; Amos *et al.*, 1976; Mahdevan und Matsudaira, 2000). Die innerhalb der Stiele liegenden Spasmoneme sind intrazelluläre, stabförmige, helikal angeordnete Organellen, die für die gleichfalls helikale Kontraktion des Stiels verantwortlich sind, in deren Folge der glockenförmige Körper dieser Ciliaten in Richtung ihres Anheftungsort gezogen wird. Es wird vermutet, dass es sich hierbei um einen Schutzmechanismus handelt (Amos, 1972).

Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Spasmoneme zeigen longitudinal angeordnete Filamente mit einem Durchmesser von 2 nm, die sich zu Bündeln zusammenlagern, durchzogen von Tubuli mit Durchmessern zwischen 38 und 70 nm (Amos, 1972; Allen, 1973). Diese filamentösen, kontraktile Elemente wurden ebenfalls im Körper der Ciliaten gefunden, wo sie eine sphärische Schrumpfung des Zellkörpers simultan zur Kontraktion der Stiele verursachen und am Stielansatz zu einer kontraktile Faser - dem Spasmonem - verschmelzen (Allen, 1973).

Levine berichtete 1956 erstmals, dass mittels Glycerin fixierte Vorticellen mit einer Kontraktion von Stiel und Zellkörper auf Ca^{2+} und andere zweiwertige Kationen reagieren. In weiteren Experimenten mit ähnlichem Versuchsaufbau stellte sich heraus, dass sowohl Strontium- als auch Barium-Ionen eine Kontraktion induzieren, wohingegen Magnesium-Ionen keine Auswirkungen zeigen (Hoffmann-Berling, 1958; Hawkes und Rahat, 1976). Hohe Magnesiumkonzentrationen im Bereich von 10^{-2} M blockieren die Kontraktion sogar irreversibel (Levin, 1956; Hoffman-Berling, 1958).

Analog zu den Forisomen benötigen die Spasmoneme für eine Konformationsänderung kein ATP, sondern lediglich die Bindungsenergie der eingesetzten Metallionen (Hoffmann-Berling, 1958; Asai *et al.*, 1978). Zudem kommt es nach Zugabe von Chelatoren wie EGTA und EDTA zu einer vollständigen Extension der Glycerin-fixierten Spasmoneme, so dass durch Austausch der Lösungen mehrere *Coiling*-Extensions-Zyklen induzierbar sind, was die Reversibilität dieser Konformationsänderung beweist (Asai *et al.*, 1978; Ochiai *et al.*, 1979).

Im Gegensatz zu den Forisomen beträgt jedoch der Schwellenwert für eine Ca^{2+} -induzierte Konformationsänderung bei den Spasmonemen nur 4×10^{-7} M. Zudem handelt es sich hierbei um eine isotrope Reaktion, die beispielsweise bei *Zoothamnium* in einer 50%igen Verringerung von Länge und Durchmesser resultiert, wobei es zu einer drastischen Volumenabnahme von ca. 86% kommt (Moriyama *et al.*, 1999).

In vivo-Studien mittels Injektion eines Ca^{2+} -sensitiven Fluoreszenzfarbstoffes in den Zellkörper von *Vorticella* zeigten, dass mechanische Stimulation desselben durch eine Mikropipette in einem transienten Anstieg der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration resultiert, der die Kontraktion von Zellkörper und Stiel auslöst (Katoh und Kikuyama, 1997). Die Kontraktion ist innerhalb von 4 msec abgeschlossen, während die Extension mehrere Sekunden in Anspruch nimmt (Jones *et al.*, 1970). Lebende Vorticellen kontrahieren trotz Vorhandenseins eines Chelators im Außenmedium (Allen, 1973; Katoh und Naitoh, 1994), was vermuten ließ, dass das für die Kontraktion der Spasmoneme notwendige Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern reaktiviert wird. Tatsächlich konnte durch zytochemische Methoden sowohl im eng mit den Spasmonemen assoziierten ER, als auch in den oben beschriebenen Tubuli im Vergleich zum Zytoplasma eine höhere Ca^{2+} -Konzentration nachgewiesen werden (Katoh und Kikuyama, 1997). Während der Influx des Ca^{2+} in das Zytoplasma und die damit verknüpfte Kontraktion der Spasmoneme innerhalb weniger Millisekunden erfolgt, dauert der aktive Transport der Ionen durch spezielle Ca^{2+} -ATPasen und somit die Extension der Spasmoneme deutlich länger.

1.5.1. Spasmin

Nach Isolierung der Spasmoneme und anschließender Auftrennung über denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese konnten als Hauptkomponenten 16-22 kDa große Proteine identifiziert werden, die so genannten Spasmine (Amos *et al.*, 1975; Asai *et al.*, 1995). Rekombinant hergestellte Spasmine konnten mittels anti-Spasmin-Antikörper verifiziert und ihre Ca^{2+} -Bindung in einem *Gel-shift-assay* nachgewiesen werden (Maciejewski *et al.*, 1999). Die überwiegend negativ geladene Aminosäuren aufweisenden, für die Ca^{2+} -Bindung und damit die Kontraktion der Spasmoneme verantwortlichen Spasmine zeigen deutliche strukturelle Ähnlichkeiten zu Centrinen. Die Funktion dieses filamentösen, mit dem Mikrotubuli-Organisations-Zentrum assoziierten und dessen Bewegung kontrollierenden Proteins (Salisbury, 1995) ist allerdings ATP-abhängig. Spasmine besitzen analog zum Centrin zwei EF-Hand-Domänen, die Orte der Ca^{2+} -Bindung. Darüber hinaus werden Spasmine durch anti-Centrin-Antikörper erkannt, was eine strukturelle Ähnlichkeit und damit

auch eine mögliche evolutive Verbindung nahe legt (Maciejewski *et al.*, 1999). In Folge dessen wurden die Spasmine in die Centrin-Familie der EF-Hand Proteine eingeordnet. Die beiden EF-Hand-Domänen der Spasmine weisen alle nötigen Eigenschaften des EF-Hand-Konsensus-Motivs auf (Maciejewski *et al.*, 1999).

1.6. **KALZIUM-BINDUNGS-MOTIVE**

1.6.1. **EF-Hand**

Die EF-Hand ist das häufigste Bindungs-Motiv Ca^{2+} -bindender Proteine (für einen Überblick siehe Nakayama und Kretsinger, 1994; Muranyi und Finn, 2001). Allein in der Pfam (protein family)-Datenbank, die sowohl Sequenzvergleiche als auch Motiv-Analysen bekannter und neuer Sequenzen erlaubt, sind zurzeit mehr als 3700 Vertreter registriert (www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/; Bateman *et al.*, 2000). Die Einteilung der EF-Hand-Proteine in 45 Unterfamilien erfolgte aufgrund von Sequenz-Homologien der analysierten Proteine und der Einheitlichkeit der Dendrogramme ihrer EF-Hand-Domänen (Kawasaki *et al.*, 1998). Die Sensitivität dieser Bindungsdomäne gegenüber sich verändernden Ca^{2+} -Konzentrationen ermöglicht die Kontrolle zahlreicher zellulärer Prozesse, wobei EF-Hand-Proteine entweder als Signaltransduktoren, häufig verbunden mit einer Konformationsänderung der Proteine, oder als Regulatoren der Ca^{2+} -Konzentration – so genannte Kalzium-Puffer-Proteine – fungieren. Typisches Strukturmerkmal der EF-Hand ist das Helix-Loop-Helix-Motiv, wobei das Kalziumion in der Schleife (Loop) zwischen den beiden α -Helices in einer pentagonalen, bipyramidalen Konfiguration gebunden wird. Ein klassischer Vertreter der EF-Hand-Proteine ist Calmodulin (CaM), ein in allen Eukaryonten vertretenes Protein und wichtiger intrazellulärer Kalzium-Rezeptor, das eine zentrale Rolle in der Regulierung des Zell-Zyklus einnimmt (Kahl und Means, 2003). Trotz der Dominanz der EF-Hand-Motive findet man in der Literatur auch andere Kalzium-Bindungsmotive, die an dieser Stelle kurz erwähnt werden sollen.

1.6.2. **Annexine**

Die Gruppe der Annexine, deren gemeinsame Eigenschaft die Kalzium-abhängige Bindung an Phospholipid-Membranen ist, sind an verschiedensten zellulären Prozessen wie Exocytose, Membrantransport, Ionentransport über die Membran, Zellwachstum und Proliferation beteiligt. Wiederholungen einer 70 AS-Domäne, die innerhalb der Mitglieder der Annexin-Familie starke Homologien aufweisen (40-70%), tragen die Konsensus-Sequenz Leu/Met-

Lys-Gly-X-Gly-Thr, die für die Ca^{2+} -Bindung dieser Proteine verantwortlich ist (Swairjo und Seaton, 1994; Seaton und Dedman, 1998; Muranyi und Finn, 2001).

1.6.3. **C2-Domäne**

Einige Multidomänen-Proteine, hauptsächlich involviert in Membrantransport und Signaltransduktion, wie Proteinkinase C, cytosolische Phospholipase und Synaptotagmin I tragen unter anderem so genannte C2-Domänen. Charakteristische Struktur dieses Motivs ist eine 130 AS umfassende Polypeptidkette, die sich zu einem achtsträngigen antiparallelen β -*Sandwich*, bestehend aus zwei viersträngigen β -Faltblättern, zusammenlagern. Untergruppen der C2-Domänen binden Ca^{2+} , wobei zwei, selten drei Schleifen zwischen den β -Faltblättern die Liganden für die Ca^{2+} -Bindung enthalten. C2-Domänen zeigen häufig zusätzlich eine Ca^{2+} -regulierte Phospholipid-Bindungsaffinität, können aber auch in die ebenfalls Ca^{2+} -abhängige Interaktion mit anderen Proteinen involviert sein (Nalefski und Falke, 1996; Rizo und Südhof, 1998; Muranyi und Finn, 2001).

1.6.4. **Lektine**

Lektine, eine strukturell heterogene Klasse sowohl bakterieller, viraler, animaler als auch pflanzlicher Proteine binden mit hoher Spezifität Kohlenhydrate und sind daher verantwortlich für die durch Zell-Oberflächen-Kohlenhydrate vermittelte Zellerkennung. Einige Untergruppen dieser Proteine, wie beispielsweise das Mannose-Bindungs-Protein, benötigen Ca^{2+} für die Kohlenhydrat-Bindung und werden daher in die Gruppe der Typ C-Lektine eingeordnet. In die Ca^{2+} -Bindung sind sowohl die Hydroxyl-Gruppen der AS-Seitenketten als auch die des Zuckers involviert, resultierend in einem Komplex aus der Kohlenhydrat-Erkennungssequenz des Proteins, Ca^{2+} und Zucker (Weis, 1996; Muranyi und Finn, 2001).

Im Mittelpunkt dieser Arbeit stehen die kontraktilen Strukturproteine des Phloems der Fabaceen. Seit der erstmaligen Beschreibung durch Strasburger 1891 beschäftigten sich zahlreiche Studien mit diesen heute als Forisome bezeichneten Proteinkörpern. Während ab 1970 hauptsächlich elektronenmikroskopische Untersuchungen im Hinblick auf die daraufhin als kristallin beschriebene Struktur der Forisome durchgeführt wurden, griffen Knoblauch *et al.* 2001 das Thema wieder auf und untersuchten die Proteinkörper hinsichtlich der Ursache ihrer Konformationsänderung. Basierend auf diesen Erkenntnissen und unter Berücksichtigung der molekularbiologischen Daten bereits analysierter Ca^{2+} -bindender Proteine, bzw. bekannter Ca^{2+} -Bindungsmotive, sollte der noch vollständig unbekannte molekulare Aufbau der Forisome näher beleuchtet werden.

Folgende Schwerpunkte bilden daher den Rahmen der vorliegenden Arbeit:

1. Aufklärung der Substruktur der Forisome hinsichtlich des Aufbaus ihrer Untereinheiten und Klonierung der dafür kodierenden Gene als übergeordnetes Ziel der Arbeit.
2. Analyse der klonierten Gene bezüglich der oben beschriebenen Kalzium-Bindungsmotive und mögliche Zuordnung der Forisome zu anderen Proteinen bzw. Proteinfamilien auf der Grundlage homologer Sequenzbereiche.
3. Rekombinante Herstellung der Forisomen-Untereinheiten im bakteriellen Expressionssystem und immunologischer Nachweis der Zugehörigkeit dieser rekombinanten Proteine zu den Forisomen.
4. Klonierung der Promotoren der Forisomen-Gene, Bestimmung der Aktivität in isolierten Protoplasten und Verortung der Bildungsregion der Forisome durch Promotoranalysen transgener Pflanzen.
5. Ausarbeitung und Erörterung eines Funktionsmodells der Forisome auf Basis der Punkte 1-4.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. MATERIAL

2.1.1. Pflanzenmaterial

- *Nicotiana tabacum* var. SR1
- *Vicia faba* cv. Witkiem major
- *Medicago truncatula*
- *Canavalia gladiata*

Die genannten Pflanzen wurden in der Klimakammer mit einem 18 h Tag- (20°C) und 6 h (15°C) Nachtrhythmus bei einer relativen Luftfeuchte von 60%, und einer Lichtintensität von 8500 Lux (Lampen-Modell SONT Agro 400 W: Phillips, Eindhoven, Niederlande) angezogen.

Die Anzucht der Pflanzen in Sterilkultur erfolgte in MS III-Medium mit einem 16 h Tag und 8 h Nachtzyklus bei 26°C und einer Lichtintensität von 10000 Lux (Lampen-Modell Flora: Phillips, Eindhoven, Niederlande).

2.1.2. Bakterienstämme und Vektoren

2.1.2.1. Bakterienstämme

a) *Escherichia coli*:

DH10B: F⁻, mcrA, Δ(mrr-hsd RMS-mcrBC), Φ80dlacZ, ΔM15, ΔlacX74, deoRrecA1, endA1, araD139, Δ(ara, leu) 7697galU, galKλ⁻rpsL, nupG (Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland)

BL21: F', hsdS, gal, (r_B⁻, m_B⁻) (Studier *et al.*, 1986)

JM109: endA1, recA1, gyrA96, thi, hsdR17 (r_k⁻, m_k⁺), relA1, supE44, *Lambda*, (lac-proAB), [F', traD36, proAB, lacI^qZ' M15] (Hanahan, 1985)

b) *Agrobacterium tumefaciens*:

LBA 4404: Cr, pAI 4404 (Hoekema *et al.*, 1983)

Nachstehende Vektoren wurden für die in der Folge beschriebenen Experimente verwendet:

- pGEM[®]-T (Promega, Madison, Wisconsin, USA)
- pGEX3 (Smith and Johnson, 1988)
- pRT101, 104 (Töpfer *et al.*, 1987)
- pUC103-GUS (K. Fritze, Köln, Deutschland)
- pBIN19 (Bevan, 1984)

pGEM[®]-T-Konstrukte:

Die direkte Klonierung der mittels PCR amplifizierten DNA-Fragmente, deren 3'-Enden durch Verwendung der Taq-Polymerase Adenylat-Überhänge aufwiesen, erfolgte in den dafür geeigneten Vektor pGEM[®]-T. Die Thymidin-Überhänge dieses linearisierten Plasmids bieten eine optimale Insertionsstelle für PCR-Produkte.

pGEX3-Konstrukte:

Die Generierung von *Sma*I-Restriktionsschnittstellen während der Amplifikation der Forisomen-Gene *mfor_1*, *mfor_2* und *mfor_3* mittels PCR, sowie der anschließende Restriktionsverdau der PCR-Produkte und des Vektors pGEX3 erlaubten die Klonierung der drei Forisomen-Gene über die *Sma*I-Restriktionsschnittstellen. Dies ermöglichte die anschließende Überexpression der Gene als Fusionsproteine mit der Glutathion-S-Transferase (GST) in *E.coli* BL21. Die Fusionsproteine werden im Laufe der Arbeit als GST/MFOR_1, GST/MFOR_2 und GST-MFOR_3 bezeichnet.

Nachstehende Oligonukleotide (Metabion, Planegg-Martinsried, Deutschland) wurden für die Amplifikation der Forisomen-Gene mit den erforderlichen *Sma*I-Restriktionsschnittstellen (in den aufgeführten Sequenzen fett hervorgehoben) verwendet:

- mfor_1*:** fw: 5'- AGA **CCC GGG** ATG TCA TTG TCC AAT GGA ACT AAA C -3'
 bw: 5'- AGA **CCC GGG** TCA TAT CTT GCC ATT CTG TGG AGC -3'
- mfor_2*:** fw: 5'- AGA **CCC GGG** ATG TCC ACT GCA TTG TCC TAT AAT G -3'
 bw: 5'- AGA **CCC GGG** TCA AAT GCA GCA ACT ATC TGG ATC ATC -3'
- mfor_3*:** fw: 5'- AGA **CCC GGG** ATG TCG TCT TCA ATG GCG CC -3'
 bw: 5'- AGA **CCC GGG** TCA AGA CCT TTT CTC AAT CTG AAC -3'

pRT101-/pRT104-Konstrukte:

Im Hinblick auf die Transfektion von Protoplasten sowie die Herstellung transgener Pflanzen mit den Forisomen-Genen *mfor_1*, *mfor_2* und *mfor_3*, unter Kontrolle des 35S-Promotors, wurden diese in die pRT-Plasmid-Serie kloniert. Dies erfolgte nach Anfügen der entsprechenden Restriktionsschnittstellen mittels PCR wie folgt:

- a) *mfor_1* mittels *NcoI/XbaI*-Restriktionsschnittstellen in den Vektor pRT104
- b) *mfor_2* mittels *NcoI/EcoRI*-Restriktionsschnittstellen in den Vektor pRT104
- c) *mfor_3* mittels *SmaI*-Restriktionsschnittstellen in den Vektor pRT101 kloniert.

Nachstehende Oligonukleotide wurden für die Amplifikation der Forisomen-Gene mit den erforderlichen Restriktionsschnittstellen (in den aufgeführten Sequenzen fett hervorgehoben) verwendet:

***mfor_1*:** fw: 5'- AGA **CCA TGG** GAT CAT TGT CCA ATG GAA CTA AAC -3'
bw: 5'- AGA **TCT AGA** TCA TAT CTT GCC ATT CTG TGG AGC -3'

***mfor_2*:** fw: 5'- AGA **ACC ATG GGA** TCC ACT GCA TTG TCC TAT AAT G -3'
bw: 5'- AGA **GAA TTC** TCA AAT GCA GCA ACT ATC TGG ATC -3'

***mfor_3*:** fw: 5'- AGA **CCC GGG** ATG TCG TCT TCA ATG GCG CC -3'
bw: 5'- AGA **CCC GGG** TCA AGA CCT TTT CTC AAT CTG AAC -3'

pUC103-GUS-Konstrukte:

Für die Funktionsanalyse der Promotoren *prom/mfor_1*, *prom/mfor_2* und *prom/mfor_3* der drei Forisomen-Gene in Protoplasten wurde jeweils ein ca. 1000 bp großes Fragment, das neben der eigentlichen Promotorsequenz auch den 5'-Bereich der Gene einschließlich des Initiationscodons aufweist, mittels PCR aus dem Genom von *M. truncatula* amplifiziert. Die translationale Fusion des Initiationscodons der einzelnen Gene zum GUS-Gen erfolgte über die folgenden, PCR-generierten Restriktionsschnittstellen auf Basis des Vektors pUC103-GUS:

- a) *EcoRI/NcoI* für *prom/mfor_1* und *prom/mfor_3*
- b) *EcoRI/RcaI* für *prom/mfor_2*

Nachstehende Oligonukleotide wurden für die Amplifikation der Forisomen-Promotoren mit den erforderlichen Restriktionsschnittstellen (in den aufgeführten Sequenzen fett hervorgehoben) verwendet:

prom/mfor_1:

fw: 5'- AGA **GAA TTC** GTC CAT TCG TAC ATG CAG -3'

bw: 5'- AGA **CCA TGG** TGA TAA ATT CAA CTT TAG G -3'

prom/mfor_2:

fw: 5'- AGA **GAA TTC** CAA ACA ATG CAA ATG AAC -3'

bw: 5'- AGA **TCA TGA** TGA TGA TTT GTT TAT AAA T -3'

prom/mfor_3:

fw: 5'- AGA **GAA TTC** CAA TCC ATT GCT TGT TAT CGC AAT C -3'

bw: 5'- AGA **CCA TGG** TAG GCC AAG AAA GTT ATT ATA TCT -3'

pBIN19-Konstrukte:

Mittels *EcoRI* Restriktionsverdau der Promotor-pUC103-GUS-Konstrukte konnten die jeweiligen Promotor-GUS-Terminator-Kassetten isoliert werden. Im Anschluss daran erfolgte die Klonierung der Promotor-Kassetten über die *EcoRI* Restriktionsschnittstellen in den Vektor pBIN19.

2.1.3. Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Alle gebräuchlichen Chemikalien und Verbrauchsmaterialien wurden von folgenden Firmen bezogen: Sigma-Aldrich (München, Deutschland), Roth (Karlsruhe, Deutschland), BioRad Laboratories GmbH (München, Deutschland) sowie Serva (Heidelberg, Deutschland).

Verwendete Enzyme und Kits stammten von den Firmen New England Biolabs (Beverly, Massachusetts, USA), Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland), Promega (Madison, Wisconsin, USA), Qiagen (Hilden, Deutschland), Macherey und Nagel (Düren, Deutschland).

Spezielle, für die beschriebenen Arbeiten notwendige Verbrauchsmaterialien wurden nachfolgend aufgelistet:

- | | |
|-----------------------------------|--|
| - Nycodenz | Axis-Shield (Oslo, Norwegen) |
| - Gewebesieb | Reichert Chemietechnik GmbH
(Heidelberg, Deutschland) |
| - 1 kb-DNA-Leiter | Invitrogen (Paisley, Großbritannien) |
| - Precision Plus Protein Standard | BioRad Laboratories GmbH (München,
Deutschland) |

2.1.4.

Geräte, Apparaturen und Zubehör

- | | |
|---|---|
| - Ultrazentrifuge, Typ: OTD75B | Sorvall (Wilmington, Delaware, USA) |
| - Kühlzentrifuge, Typ: 4810R | Eppendorf (Hamburg, Deutschland) |
| - Tischzentrifuge, Typ: Mikro Rapid/K | Hettich-Zentrifugen (Tuttligen, Deutschland) |
| - Mikroskop, Typ: DMLFS | Leica (Wetzlar, Deutschland) |
| - Kamera, Typ: TK-C1360 | JVC (Tokio, Japan) |
| - Aktiv schwingungsisolierender Tisch, Typ: Modell 1 | Halcyonics (Göttingen, Deutschland) |
| - Mikromanipulatoren, Typ: Mini 25 | Luigs und Neumann (Ratingen, Deutschland) |
| - Laserpuller, Typ: Modell 2000 | Sutter Instruments (Novato, California, USA) |
| - Konfokales Laser Scanning Mikroskop Typ: Leica TCS 4D | Leica (Wetzlar, Deutschland) |
| - T3 Thermocycler | Biometra (Göttingen, Deutschland) |
| - Gelelektrophorese-Power Pac | BioRad Laboratories GmbH (München, Deutschland) |
| - Digitalkamera, Typ: Camedia C720 | Olympus (Hamburg, Deutschland) |
| - UV-Tisch | Peqlab (Erlangen, Deutschland) |
| - Geldokumentations-Anlage | BioRad Laboratories GmbH (München, Deutschland) |
| - CCD-Kamera Typ: LAS 1000 | RAYTEST GmbH (Straubenhardt, Deutschland) |
| - VERSAFLUOR TM Fluorometer | BioRad Laboratories GmbH (München, Deutschland) |
| - Wasserbad, Typ: Cryo Compact Thermostat | Julabo (Allentown, Pennsylvania, USA) |

Forisome, der in Folge des Mörserns bereits aufgebrochenen Siebelemente konnten somit ausgewaschen werden und befanden sich anschließend im Filtrat, während das im Überstand befindliche Pflanzenmaterial erneut unter flüssigem Stickstoff pulverisiert wurde. Die Arbeitsschritte Mörsern und Filtrieren wurden insgesamt dreimal durchgeführt. Dadurch konnte gewährleistet werden, dass die SE des Phloems sukzessive aufgebrochen und die Forisome freigesetzt wurden; währenddessen verhinderte der Filtrierschritt ein „Zermörsern“ der bereits extrazellulären Proteinkörper. Die Zentrifugation des Filtrats und anschließendes Rücklösen des Pellets in einem entsprechend geringem Volumen V-Medium resultierten in einer, mittels lichtmikroskopischer Aufnahmen nachgewiesenen Anreicherung der Forisome.

2.2.1.3. Präparation des Nycodenz[®]-Gradienten

Die Trennung der Forisome von ebenfalls noch im Filtrat befindlichem Pflanzenmaterial erfolgte mittels Dichtegradientenzentrifugation. Die Homogenisierung von Filtrat und dem substituierten Isophtalamid Nycodenz[®] ermöglichte unter Verwendung eines Gradientengießers die Herstellung eines kontinuierlichen Dichte-Gradienten von 80% Nycodenz[®] am Boden bis 20% Nycodenz[®] am oberen Rand des Zentrifugenröhrchens. Die geringe Viskosität aber auch die geringe Ionenstärke des Nycodenz[®] ermöglichte mittels dreistündiger Ultra-Zentrifugation bei 21000 rpm (Rotor AH627) eine Auftrennung der einzelnen Komponenten aufgrund ihrer Dichte. Neben einer distinkten Chloroplastenbande bei ca. 25% Nycodenz[®], einer Membranbande bei ca. 50% Nycodenz[®] und einem Zellwandpellet konnte im Fall von *V. faba* eine weitere Bande bei ca. 60% Nycodenz[®] beobachtet werden. Lichtmikroskopische Aufnahmen zeigten, dass es sich hierbei um die Forisome handelt. Die Aufreinigung der *C. gladiata* - Forisome ergab dagegen keine optisch abgrenzbare Bande, allerdings zeigten auch hier lichtmikroskopische Aufnahmen, dass die Proteinkörper dieser Pflanze ebenfalls bei ca. 60 % Nycodenz[®] angereichert wurden. Mittels Modifikationen der Zusammensetzung des V-Mediums soll in der Folge allerdings auch für *C. gladiata* die Ausbildung einer distinkten Forisome-Bande erreicht werden.

2.2.2. Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Alle in der vorliegenden Arbeit beschriebenen SDS-PAGEs wurden in einem diskontinuierlichen Puffersystem nach Laemmli (1970) durchgeführt. Die Konzentration von Acrylamid/Bisacrylamid des Trenngels betrug je nach Experiment entweder 7% oder 10%, während das Sammelgel eine Konzentration von 3% aufwies. Die Denaturierung der aufzutrennenden Proteine wurde mittels 10minütiger Inkubation derselben in 1x Probenpuffer

bei 98° C erreicht. Die Durchführung der SDS-PAGE erfolgte in einer BioRad Minigel-Aparatur bei konstanten 40 mA und variabler Spannung. Zur Bestimmung des Molekulargewichtes der elektrophoretisch aufgetrennten Proteine diente ein Standard bestehend aus Proteinen bekannter Größen (Presicion Protein Standards, BioRad München).

Die Färbung der Proteine erfolgte mittels 30minütiger Inkubation der SDS-Polyacryamid-Gele (SDS-PAA-Gel) in einer, den Proteinfarbstoff Coomassie Brilliant Blue enthaltenden Färbelösung, die Entfärbung des Gels durch wiederholten Austausch der Entfärbelösung (Sambrook *et al.*, 1989).

SDS-PAA-Gele der in 2.2.3. beschriebenen, zweidimensionalen SDS-PAGE wurden – aufgrund der zehnfach höheren Sensitivität – mittels Silberfärbung, beruhend auf dem Prinzip der reduktiven Bildung atomaren Silbers aufgrund reduzierender Gruppen des Proteins, visualisiert.

Lösungen:

<u>10%iges Trenn-/3%iges Sammelgel</u>	Menge Trenngel	Menge Sammelgel
Stammlösung (30% Acrylamid; 0,8% Bisacrylamid)	1000 µl	333µl
1,88 M Tris-HCl, pH 8,8 / 0,625 Tris-HCl, pH 6,8	600 µl	400 µl
0,5% SDS-Lösung	600 µl	400 µl
H ₂ O bidest.	800 µl	870 µl
TEMED	2,5 µl	2 µl
10% Ammonium Persulfat (APS)	15 µl	10 µl

Probenpuffer:

Tris-HCl	62,5 mM
Glycerin	10% (w/v)
SDS	2% (w/v)
β-Mercaptoethanol	5% (w/v)
Bromphenolblau	0.05% (w/v)

Laufpuffer:

Tris-HCl	25 mM
Glycin	187 mM
SDS	0,1% (w/v)

2.2.3.

Zweidimensionale SDS-PAGE

Zur Identifizierung Ca²⁺-reaktiver Untereinheiten der Forisome wurde eine zweidimensionale SDS-PAGE durchgeführt (Kameshita und Fujisawa, 1997). Die Methode basiert auf dem unterschiedlichen Laufverhalten Ca²⁺-bindender Proteine in Ca²⁺-freien und Ca²⁺-haltigen SDS-PAA-Gelen, daher auch als *mobility-shift-assay* bezeichnet. Das Trenngel der ersten Dimension enthielt CaCl₂ mit einer Endkonzentration von 2 mM. Ein Gemisch aus ca. 7 µg aufgereinigter Forisome und 6 µg *random*-Polymere, bestehend aus Glutamin, Lysin und Tyrosin im Verhältnis 6:3:1, wurden in eine Spur geladen und die SDS-PAGE unter in 2.2.2.

aufgeführten Bedingungen durchgeführt. Kurz nach Auslauf der Bromphenolblau-Front aus der Gelmatrix, wurde die SDS-PAGE gestoppt, die die aufgetrennten Proteine enthaltende Spur longitudinal ausgeschnitten und 10 min bei RT in EDTA-haltigem Äquillibrierungspuffer inkubiert. Das Trenngel der zweiten Dimension enthielt, analog dem der ersten Dimension, EDTA mit einer Endkonzentration von 2 mM. Die Präparation einer großen Tasche im Sammelgel ermöglichte es, den äquillibrierten Gelstreifen horizontal zu platzieren. Erneute SDS-PAGE gewährleistete somit die Auftrennung der Proteine in der zweiten Dimension.

Proteine, wie die eingesetzten *random*-Polymere, die nicht auf Kalzium reagieren, bilden in diesem System eine diagonale Linie in der zweiten Dimension. Lediglich Ca^{2+} -bindende Proteine, induziert durch ihr unterschiedliches Laufverhalten in EDTA- oder Ca^{2+} -haltigen Gelen, bilden von der Linie abweichende Spots. Als Kontrolle diente die zweidimensionale SDS-PAGE unter Einfluss von EDTA in beiden Dimensionen. Anschließend erfolgte die Silberfärbung der Proteine.

2.2.4.

Genome Walking

Alle in dieser Arbeit mittels des *Genome Walking* amplifizierten und klonierten DNA-Fragmente wurden unter Verwendung des „BD GenomeWalker™ Universal Kit“ (BD Biosciences Clontech, Heidelberg, Deutschland) nach dem entsprechenden Protokoll des Herstellers durchgeführt.

Mittels dieser Methode ist die Klonierung unbekannter genomischer Sequenzen unter der Voraussetzung möglich, dass eine kurze Teilsequenz beispielsweise auf cDNA-Ebene bekannt ist (Siebert *et al.*, 1995). Zu diesem Zweck erfolgte die Präparation genomischer DNA von *V. faba* sowie der anschließende Restriktionsverdau in vier Aliquots mit je einem Restriktionsenzym (*Stu*I, *Dra*I, *Sma*I, *Eco*RV) zur Generierung glatter Schnittstellen. Nach Phenol/Chloroform-Extraktion der genomischen DNA erfolgte die Ligation des von der Firma bereitgestellten „BD GenomeWalker™“ Adaptors – einer kurzen doppelsträngigen DNA mit bekannter Sequenz – an das 5'- und 3'- Ende der geschnittenen und aufgereinigten DNA-Fragmente.

Die *primary* PCR wurde mittels des äußeren Adaptor-Oligonukleotids AP1 und des genspezifischen Oligonukleotids GSP1 auf Ebene der adaptor-ligierten DNA-Fragmente durchgeführt. Die Verwendung eines speziellen Polymerasemixes (BD Advantage™ 2 Polymerase Mix; BD Biosciences Clontech, Heidelberg, Deutschland) ermöglichte die Generierung langer PCR-Fragmente durch die BD TITANIUM™ Taq DNA Polymerase,

entwickelt für eine *long-distance* PCR (LD-PCR; Barnes, 1994; Cheng *et al.*, 1994), sowie fehlerfreier PCR-Fragmente durch die ebenfalls im oben genannten Mix enthaltene *proofreading*-Polymerase. Im Anschluss daran erfolgte die *secondary* PCR unter Verwendung des internen Adaptor-Oligonukleotids AP2 und des internen genspezifischen Oligonukleotids GSP2. Nach erfolgreicher Amplifikation und Klonierung genomischer Fragmente erfolgte die automatische Sequenzanalyse mittels des ABI 3730 Sequenzierautomaten (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland).

2.2.5. Sequenzanalyse der Peptide und DNA-Fragmente

Peptidsequenzierung:

Die Generierung von Peptidsequenzen der über SDS-PAGE aufgetrennten Forisomen-Untereinheiten erfolgte unter Verwendung des Edmann-Verfahrens, dem schrittweisen Abbau eines Peptids durch sukzessive Abspaltung der N-terminalen Aminosäure und deren anschließende Identifizierung mittels *high pressure liquid chromatography* (HPLC). Des Weiteren erfolgte der Einsatz massenspektrometrischer Sequenzanalysen für die Peptidsequenzierung nach tryptischem Verdau der Proteine bzw. chemischer Spaltung unter Verwendung von Bromcyan.

An die nachstehenden Firmen und Institute wurden die Proteine für die Sequenzierung übersandt:

- Proteom Factory (Berlin, Deutschland)
- TopLab (München, Deutschland)
- Fraunhofer IME (Aachen, Deutschland)

Automatische Sequenzanalyse von DNA-Fragmenten:

Nach dem Prinzip des Kettenabbruchverfahrens von Sanger *et al.* (1977) wurden die im Laufe der Arbeit verwendeten DNA-Sequenzen auf dem ABI 3730 Sequenzierautomaten unter Verwendung der BigDye-Terminator Methode durch die ZEDA-Service-Einheit am Fraunhofer IME in Aachen generiert.

Sequenzanalysen erfolgten unter Verwendung der Computer-Software „Accelrys SeqWeb Version 2“ (Devreux *et al.*, 1984; www.gcserver.rwth-aachen.de/gcg-bin/seqweb.cgi).

2.2.6. Rekombinante Protein-Expression in *E. coli*

Die Expression der Forisomen-Gene *mfor_1*, *mfor_2* und *mfor_3* erfolgte nach ihrer jeweiligen Klonierung in den Expressionsvektor pGEX3 (2.1.2.2.) und anschließender

Transformation der Konstrukte in *E.coli* BL21 als Fusionsproteine mit der Glutathion-S-Transferase (GST; 27,5 kDa), in der Folge als GST/MFOR_1, GST/MFOR_2 und GST/MFOR_3 bezeichnet. Die Überexpression wurde durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration 1 mM) induziert, gefolgt von einer dreistündigen Inkubation der Bakterienkultur bei 37°C. Eine Steigerung der Ausbeute an löslichem GST/MFOR_1-, GST/MFOR_2- und GST/MFOR_3-Fusionsprotein konnte durch eine weitere, zweistündige Inkubation bei 42°C erreicht werden.

2.2.6.1. Aufreinigung der GST-Fusionsproteine mittels Affinitätschromatographie

2.2.7. Western-Blot-Analyse

1. AK	Organismus	Verdünnung	2.Antikörper	Org.	Verdünnung
anti-MFOR_1	Kaninchen	1 : 500	goat-anti-rabbit ^{HRP}	Ziege	1 : 20000
anti-MFOR_2	Kaninchen	1 : 500	goat-anti-rabbit ^{HRP}	Ziege	1 : 20000
anti-vf	Maus	1 : 250	goat-anti-mouse ^{HRP}	Ziege	1 : 20000
anti-can	Maus	1 : 250	goat-anti-mouse ^{HRP}	Ziege	1 : 20000
anti-GST	Maus	1 : 5000	goat-anti-mouse ^{HRP}	Ziege	1 : 20000

Die Verwendung des SuperSignal[®] West Dura-Kit (PIERCE, Bonn, Deutschland), inklusive des goat-anti-rabbit^{HRP}- oder des goat-anti-mouse^{HRP}-Antikörpers, nach dem Protokoll des Herstellers ermöglichte die Detektion des an die Proteine gebundenen 1. Antikörpers mittels Chemilumineszenz durch die Enzymreaktion der *horse raddish peroxidase* (HRP). Die Aufnahmen erfolgten unter Verwendung der CCD-Kamera des Typs LAS 1000.

2.2.8. Immunologischer Nachweis nativer Forisome mittels CLSM

Mittels der Schnellaufreinigung (2.2.1.) erhaltene Forisome wurden in Mikrotiterplatten überführt und anschließend bei 4000 rpm zentrifugiert, wobei die Proteinkörper aufgrund ihrer Oberflächenbeschaffenheit am Boden der Platten haften blieben. Dies ermöglichte die problemlose Inkubation der Forisome mit den Antikörpern sowie die notwendigen Waschschrte. Als jeweils erster Antikörper dienten die in Abschnitt 2.2.7. aufgeführten Immunseren und deren Verdünnungen, während der folgende zweite Antikörper mit einer Verdünnung von 1: 5000 verwendet wurde:

Alexa Fluor[®] 488 goat-anti-rabbit IgG (H+L) *2 mg/ml *(Molecular Probes, USA)

Die Detektion erfolgte unter Verwendung des Leica TCS 4D konfokalen Laser Scanning-Mikroskops nach Anregung mittels der 488 nm Linie des 75 mW Argon/Krypton Lasers. Durch den Fluorescein Bandpass Filter wurde das emittierte Licht zum Detektor geleitet. Für eine optimale Vergrößerung wurde das Objektiv HCX APO L40x/0.80 W U-V-I eingesetzt.

2.2.9. Promotoranalysen

Im Hinblick auf die Bestimmung der Aktivität der Promotoren der Forisomen-Gene erfolgte die fluorimetrische Messung der Expression der Promotor/GUS-Fusionen (Promotor-pUC103-GUS-Konstrukte; 2.1.2.2.) in Protoplasten. Die stabile Integration der Promotor/GUS-Konstrukte ins Genom transgener Pflanzen erfolgte über Agrobakterien-

vermittelten Gentransfer unter Verwendung des binären Vektorsystems pBIN19 (2.1.2.2.) und sollte Aufschluss über eine eventuelle Gewebespezifität der Promotoren geben.

2.2.9.1.

Transiente Expression in Protoplasten

Präparation von Protoplasten:

Blätter 6-8 Wochen alter, in Sterilkultur angezogener Tabakpflanzen (*Nicotiana tabacum* var. SR1) wurden in K3-Medium – versetzt mit einer Enzymmischung aus 0,5 % (w/v) Cellulase und 0,5% (w/v) Mazerozym – über Nacht bei 26°C im Dauerdunkel inkubiert. Nach 30minütigem Schütteln der Pflanzensuspension wurde diese mittels eines Stahlsiebs mit 250 µm Maschenweite filtriert. Im Anschluss an die Überführung des Filtrats in ein 50 ml Reaktionsgefäß und einen 5minütigen Zentrifugationsschritt (1000 rpm, Eppendorffzentrifuge) folgte die Trennung der flotierenden Protoplasten von Zelltrümmern und überschüssigem Medium. Wiederholtes Waschen der Protoplasten mit W5-Medium resultierte in der vollständigen Elimination von Enzymkontaminationen und Zelltrümmern.

Lösungen:

K3-Medium

MS-Basalsalze mit Vitaminen	4,4 g
Saccharose	140 g
Xylose	250 mg
H ₂ O	auf 1000 ml
pH-Wert	5,6 – 5,7
Osmotischer Wert	600 mOs

W5-Medium

NaCl	9 g
CaCl ₂	18,4 g
KCl	370 mg
Glucose	991 mg
H ₂ O	auf 1000 ml
pH-Wert	5,6-6

Transfektion von Protoplasten:

Die Protoplastenlösung wurde mittels Zugabe von MaMg-Medium auf eine Zelldichte von ca. 10⁶ Protoplasten/ml eingestellt und anschließend zu 330 µl in 10 ml-Reaktionsgefäße aliquotiert. Nach Zugabe der DNA (10 µg Plasmid-DNA / 15 µl Gesamtvolumen) wurde die Protoplastensuspension für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend die PEG-Lösung im Verhältnis 1:1 zugefügt und der Ansatz erneut für 25 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 4 ml K3-Medium erfolgte die Inkubation der Transfektionsansätze über Nacht im Dauerdunkel bei 26°C.

MaMg-Medium

Mannitol	84,23 g
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	3,05 g
MES	1 g
H ₂ O	auf 1000 ml
pH-Wert	5-6

PEG-Lösung

Ca(NO ₃) ₂ x 4 H ₂ O	2,36 g
Mannitol	7,29 g
PEG 4000	40 g
H ₂ O	auf 100 ml
pH-Wert	7-9

β -Glukuronidase-Aktivitätstest (GUS-Test):

Mittels Zugabe von W5-Medium und anschließender Zentrifugation wurden die Protoplasten pelletiert. Überführung der Protoplasten-Pellets in flüssigen Stickstoff, anschließende Aufnahme in je 50 μ l GUS-Extraktionspuffer und der Einfluss der Scherkräfte durch wiederholtes Pipettieren resultierten in der Lyse der Plasmamembran und damit dem Aufschluss der Protoplasten. Im Anschluss an die Proteinbestimmung mittels Bradford-Reagenz (Bradford, 1976) und der dadurch ermöglichten Standardisierung der Protoplasten-Extrakte erfolgte die fluorimetrische Messung der Umsetzung der zugegebenen Chemikalie 4-Methyl-Umbelliferyl-Glukuronid (4-MUG) zu ihrem fluoreszierenden Endprodukt 4-Methyl-Umbelliferon (4-MU; nach Jefferson, 1987). Anschließend Verwendung der gemessenen Werte und MU-Standardkurven resultierten in der Berechnung der Enzymaktivität (pmol 4-MU/mg Protein und min).

Lösungen:

GUS-Extraktionspuffer

NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄ (pH 7,0)	50 mM
β -Mercaptoethanol	10 mM
Na ₂ EDTA	10 mM
Triton X-100	0,1% (w/v)

2.2.9.2.

Expressionsstudien in transgenen Pflanzen

Pflanzentransformation:

Nach der Transformation des Agrobakterien-Stamms LBA 4404, anschließender Anzucht der Bakterien in YEB-Medium bei 28°C, Zentrifugation und einmaligem Waschen des Pellets mit MgSO₄ erfolgte die Einstellung der optischen Dichte (OD=1) mittels MS I-Medium. Blattstücke steril angezogener 6-8 Wochen alter Tabakpflanzen wurden danach mit der Bakterienkultur inkubiert und anschließend mit MS I-Medium gewaschen. Die Kultivierung der wundinfizierten Blattstücke erfolgte auf MS I-Agar-Platten für 2 Tage bei 26°C im Dauerdunkel. Ein erneuter Waschschrift mit MS I und zugesetztem Claforan (250 mg/l) resultierte in der Elimination der Agrobakterien. Der Transfer der infizierten Blattstücke auf MS II-Platten, die die Hormone NAA (Naphtolsäure; 0,1 mg/l) und BAP (Benzylaminopurin; 0,5 mg/l), sowie das Antibiotikum Kanamycin (0,1 mg/l) enthielten, führte zur Induktion der Regeneration von Kalli und nachfolgend von Sprossen. Die anschließende Überführung der Sprosse auf Saccharose-haltiges, hormonfreies MS III-Medium induzierte das Wurzelwachstum. Die vollständig regenerierten Pflänzchen wurden auf Erde überführt und im Gewächshaus unter in 2.1.1. genannten Bedingungen angezogen.

Histochemischer β -Glukuronidase-Nachweis:

Der Nachweis der β -Glukuronidase-Aktivität unter Kontrolle der Forisomen-Promotoren erfolgte mittels des chromogenen Substrats 5-Brom-4-chlor-3-indolyl-glukuronid (X-Gluc) (nach Jefferson, 1987). Dafür wurden Blätter, Blattstücke, Stängel- und Wurzelquerschnitte über Nacht bei 37°C in 3 mM X-Gluc (in 50 mM Phosphatpuffer) inkubiert. Bis zur vollständigen Entfärbung des Blattgrüns wurden die Pflanzenteile bei 60°C für ca. 1 h mit 100% Methanol versetzt und anschließend in 70%igem Ethanol gelagert. Die Dokumentation der Färbung ganzer Blätter und Blattstücke erfolgte mittels der Digitalkamera des Typs Camedia C720, lichtmikroskopische Beobachtungen auf zellulärer Ebene wurden mit der Kamera des Typs TK-C1360 festgehalten.

2.2.10

Standardmethoden

Alle in dieser Arbeit angeführten Standardmethoden, die entsprechenden Protokolle sowie die verwendeten Kits sind in der folgenden Übersicht zusammengefasst:

Methode	Protokoll/Kit
Präparation genomischer DNA	a) Current protocols (CTAB) b) DNeasy [®] Plant Maxi Kit (QIAGEN, D)
Präparation von polysomaler RNA	Leiser <i>et al.</i> , 1992
Extraktion von poly A ⁺ mRNA	Oligotex [™] mRNA Kit (QIAGEN, D)
cDNA-Synthese	SUPERSCRIPT [™] First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen, GB)
Plasmid-Präparation	NUCLEOBOND 100 (Macherey-Nagel, D)
Fragment-Elution aus Agarosegelen	QIAEX II Gel Extraction Kit (QIAGEN, D)
Aufreinigung doppelsträngiger DNA nach PCR, Restriktionsverdau, Klenow- <i>repair</i>	PCR-Purifikation Kit (QIAGEN, D)
Restriktionsverdau	Protokoll der Hersteller (NEB,USA; Roche, Deutschland)

Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Experimente zur molekularen Charakterisierung der Forisome wurden unter Verwendung folgender Vertreter der Fabaceen durchgeführt: *Vicia faba*, *Canavalia gladiata* und *Medicago truncatula*. Lichtmikroskopische Aufnahmen der Abb. 3 zeigen die beiden Konformationszustände schnell aufgereinigter (2.2.1.) Forisome der drei verwendeten Arten, da dies *in vitro* bisher nur für die Proteinkörper aus *V. faba* dargestellt wurde (Knoblauch *et al.*, 2003).

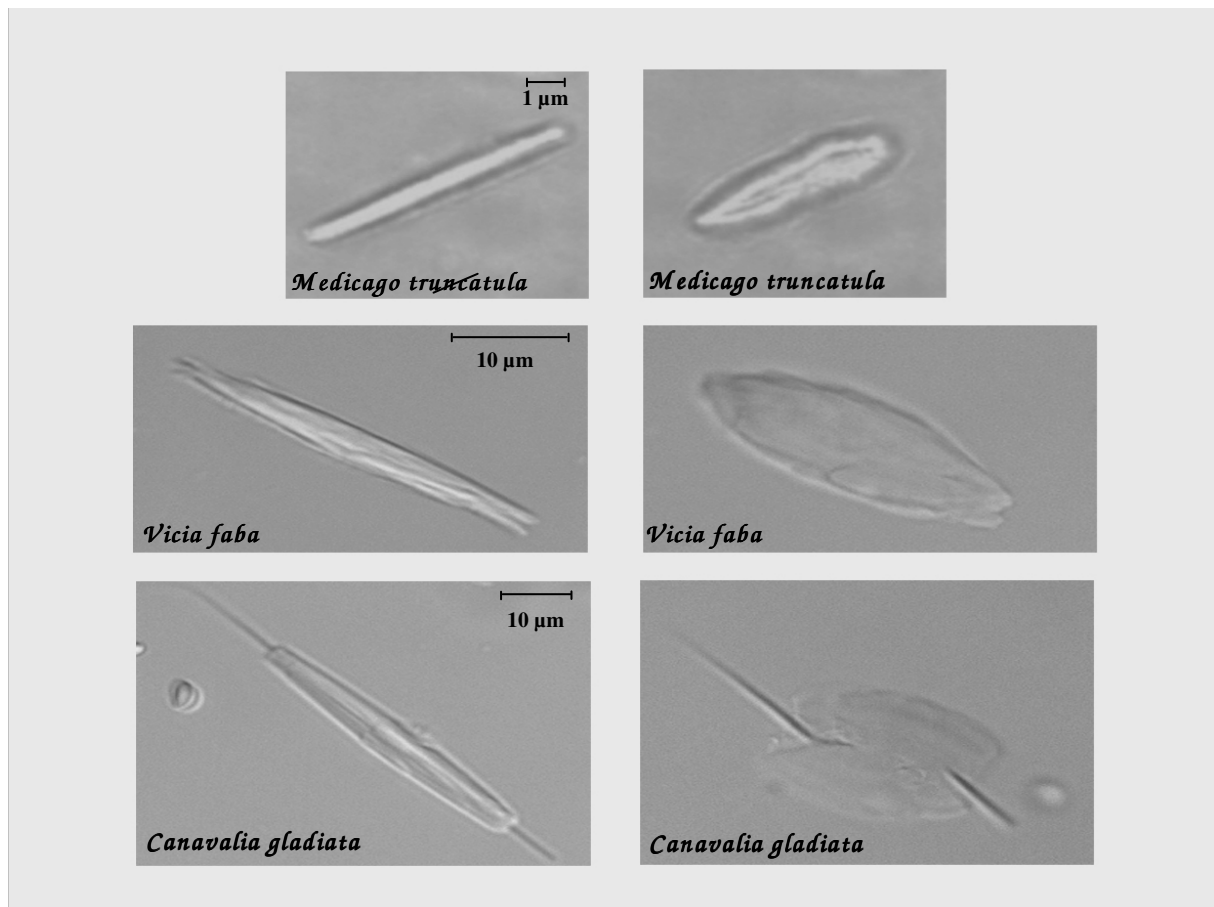


Abb. 3: Forisome von *V. faba*, *C. gladiata* und *M. truncatula* und ihre Kalzium-Reaktivität

Die drei linksseitigen Aufnahmen zeigen den kondensierten Konformationszustand der Proteinkörper unter Ausschluss von Ca²⁺. Die rechtsseitigen Aufnahmen dokumentieren den dispergierten Konformationszustand der Forisome nach Zugabe von 1 mM Ca²⁺.

M. truncatula weist im Verhältnis zu *V. faba* und vor allem zu *C. gladiata* sehr kleine Forisome auf, aufgrund des geringen Durchmessers der Sprossachsen von *M. truncatula* und

der somit ebenfalls sehr geringen Größe der Siebelemente. Die Proteinkörper von *C. gladiata* zeigen beidseitig des spindelförmigen Zentralkörpers schwanzartige Fortsätze, die für Vertreter mehrerer Gattungen der Fabaceen charakteristisch sind (Esau, 1978). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die isolierten Proteinkörper der drei Arten auf die Zugabe von Ca^{2+} *in vitro* mit einer Konformationsänderung in den dispergierten Zustand reagieren. Auffällig ist der kondensierte Konformationszustand der schwanzartigen Fortsätze von *C. gladiata* auch in Anwesenheit von Ca^{2+} im umgebenden Medium.

Das Vorkommen der Forisome in *V. faba*, *C. gladiata* und *M. truncatula* und die Ca^{2+} -induzierte Konformationsänderung der Proteinkörper bildeten die Grundlage für die durchgeführten und nachfolgend beschriebenen Experimente.

3.1. MOLEKULARE CHARAKTERISIERUNG DER FORISOMEN-GENE

3.1.1. Gelelektrophoretische Auftrennung der *V. faba* - Forisome

Die Aufreinigung der Forisome aus *V. faba* erfolgte nach Vorreinigung des Phloems mittels Dichtegradientenzentrifugation (2.2.1.). Nach Abnahme der Forisomenbande (Abb. 4A) aus dem Nycodenz[®]-Gradienten konnten durch einen erneuten Zentrifugations- und Waschschriff Kontaminationen wie Membranreste und andere Proteine entfernt werden. Hierfür wurden die Forisome in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt, diese mit V-Medium (2.2.1.1.) aufgefüllt und anschließend bei 15000 rpm zentrifugiert. Im Anschluss daran konnte mittels Lichtmikroskopie beobachtet werden (Abb. 4 B), dass die Forisome an der Wand des Reaktionsgefäßes haften blieben, während das restliche Pflanzengewebe pelletierte. Sowohl Pellet als auch Überstand wurden verworfen und das Reaktionsgefäß mit den daran haftenden Forisomen mit V-Medium gewaschen. Diese zusätzliche Aufreinigung der Forisome ermöglichte eine deutliche Reduzierung der Banden ko-aufgereinigter Proteine in der SDS-PAGE (2.2.2.). Nach Lösen und Aufnahme der Forisome in 1x Ladepuffer erfolgte die Auftrennung der Proteinkörper in einem 7%igen SDS-PAA-Gel (Abb. 4C).

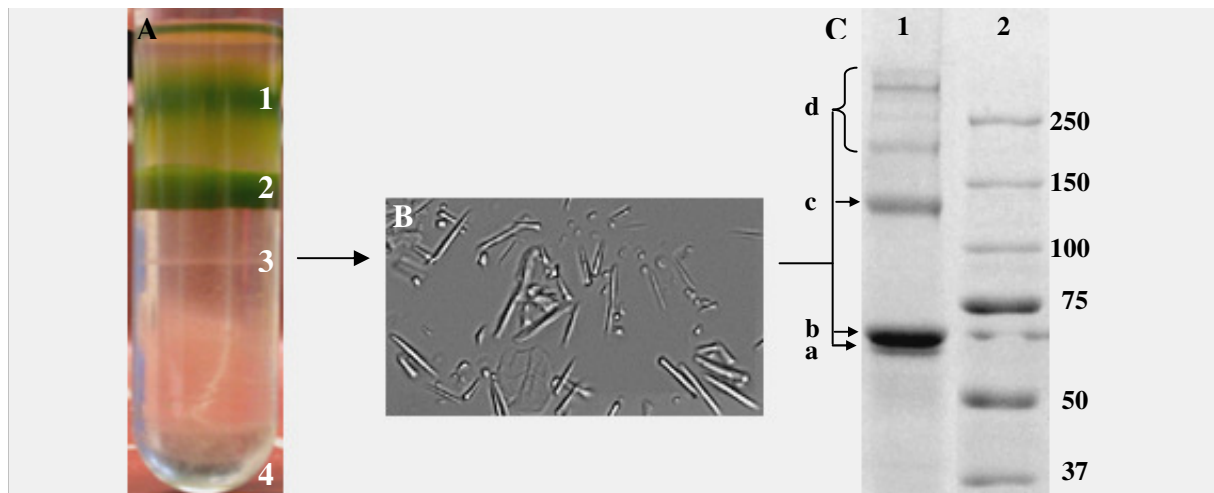


Abb. 4: Aufreinigung und Auftrennung der Forisome aus *V. faba*

(A) Nycodenz[®]-Gradient; folgende Pflanzenbestandteile bandieren aufgrund ihrer Dichte:

1) Chloroplasten, 2) Membranpartikel, 3) Forisome, 4) Zellwandpartikel

(B) Lichtmikroskopische Aufnahme der Forisome aus *V. faba* nach Abnahme der Bande 3 aus dem Nycodenz[®]-Gradienten

(C) 7%iges SDS-PAA-Gel nach Färbung mit Coomassie Brilliant Blue: **Spur 1:** ca. 7 µg aufgereinigte Forisome aus *V. faba*; **Spur 2:** 5 µl Proteinmarker

Das zu beobachtende Protein-Bandenmuster nach Färbung des SDS-PAA-Gels mit Coomassie Brilliant Blue (Abb. 4C) zeigt, dass es sich bei den Forisomen von *V. faba* um Proteinkomplexe, bestehend aus mehreren Untereinheiten (UE) mit Molekulargewichten von ca. 200-350, 130 und ca. 70 kDa, handelt (siehe Bezeichnung d-a in Abb. 4C). Während die größere (b) der auf der Höhe von ca. 70 kDa bandierenden Untereinheiten (a und b) den mengenmäßigen Hauptanteil bildet, könnten die Proteine mit Molekulargewichten von 130 kDa (c) und 200-350 kDa (d) aufgrund ihrer Größe Dimerisierungs- bzw. Multimerisierungsderivate der beiden kleineren Proteine (a und b) darstellen. Es könnte sich hier jedoch auch um eigenständige Untereinheiten der Forisome handeln. Kontaminationen mit anderen Proteinen wurden durch die oben beschriebene Vorreinigung (3.1.1.) stark reduziert, lassen sich allerdings nicht völlig ausschließen.

3.1.2.1. Bestimmung von Peptidsequenzen mittels direkter und massenspektrometrischer Sequenzanalyse

Nach der Auftrennung aufgereinigter Forisome wurde die ca. 70 kDa große Untereinheit (Abb. 4 C, Bande b) aus dem SDS-PAA-Gel isoliert. Allerdings konnte trotz geringer Polyacrylamidkonzentration im Gel und relativer langer Laufzeit der Elektrophorese keine vollständige Auftrennung der beiden bei ca. 70 kDa bandierenden Untereinheiten (Abb. 4 C, Bande a und b) erreicht werden.

Die Sequenzierung der N-terminalen Aminosäuren unter Verwendung des Edmann-Verfahrens war aufgrund der Blockierung des Aminoterminus des Proteins nicht möglich. Daher erfolgte nach enzymatischer Spaltung der Polypeptidkette durch die Endopeptidase Trypsin die Generierung und Sequenzierung interner Peptide. Die mittels ESI- (*electrospray ionisation*) oder MALDI-Ionisierung (*matrix assisted laser desorption ionisation*) durchgeführten massenspektrometrischen Sequenzanalysen (2.2.5) resultierten ebenfalls in mehreren Peptidsequenzen, die in Tabelle 1B (S. 38) zusammengefasst sind.

Es muss davon ausgegangen werden, dass die ermittelten Peptidsequenzen aufgrund der Überlagerung der Proteinbanden im SDS-PAA-Gel aus verschiedenen Untereinheiten generiert wurden und damit nicht eindeutig zugeordnet werden konnten, was die in 4.2. beschriebenen Schwierigkeiten bei der Durchführung der PCR erklärt.

3.1.2.2. PCR unter Verwendung degenerierter Oligonukleotide

Die direkte Sequenzierung der ca. 70 kDa großen Untereinheit (Abb. 4 C, Bande b) aufgetrennter *V. faba*-Forisome – durch Einsatz des Edmann-Verfahrens – resultierte in lediglich einer, 7 AS umfassenden, Peptidsequenz. Somit erfolgte die Ableitung degenerierter Oligonukleotide hauptsächlich von Peptiden, die durch massenspektrometrische Sequenzanalyse generiert wurden.

Unter Verwendung dieser Oligonukleotide, entweder auf der Basis genomischer DNA oder in der Folge auf cDNA-Ebene von *V. faba*, konnten mehrere PCR-Fragmente amplifiziert und kloniert werden (~2000 Fragmente), die jedoch nach automatisierter Sequenzanalyse (2.2.5.) die identifizierten, Forisomen-spezifischen Peptide nicht aufwiesen. Eine Zuordnung dieser DNA- bzw. cDNA-Fragmente zu den Forisomen-Genen war somit nicht möglich. Auch die Verwendung genomischer DNA-Fragmente nach beidseitiger Adapter-Ligation und der

dadurch ermöglichte Einsatz lediglich eines degenerierten Oligonukleotids im *GenomeWalker*TM-System (2.2.4.) führte zu keinerlei Erfolg versprechenden Resultaten.

3.1.2.3.

Datenbanksuche

Neben den bereits abgeschlossenen Projekten zur Entschlüsselung pflanzlicher Genome (z.B. *Arabidopsis thaliana* und *Oryza sativa*) wurde kürzlich mit der Generierung und Sequenzierung von ESTs für *Medicago truncatula* als Modellpflanze der Fabaceen begonnen. Diese stetig erweiterte öffentliche EST-Datenbank (<http://medicago.toulouse.inra.fr/Mt/EST>) wurde in der Folge für den Abgleich der ermittelten Peptidsequenzen der ca. 70 kDa großen Untereinheit der *V. faba*-Forisome genutzt.

Unter Verwendung dieser Datenbank konnte daraufhin eine 157 AS umfassende Polypeptidkette sowie das dafür kodierende, 478 bp große cDNA-Fragment gefunden werden. Dieses Fragment wies die in Tabelle 1B (S. 38) aufgelisteten Peptidsequenzen EGFDIAFK und VMEVTSLNYK auf, die durch massenspektrometrische Sequenzanalyse der Forisome aus *V. faba* ermittelt wurden, mit lediglich 2 AS-Austauschen für das zweite Peptid. Diese Sequenzabweichung resultiert wahrscheinlich aus den zu erwartenden Unterschieden der AS-Sequenzen zwischen den verschiedenen Arten *M. truncatula* und *V. faba*.

Mittels dieser – durch Verwendung der Datenbank ermittelten – Sequenzinformationen konnten spezifische Oligonukleotide für die PCR abgeleitet werden. Auf Basis genomischer DNA von *V. faba* gelang daraufhin die Amplifikation eines ca. 500 bp großen PCR-Fragmentes. Die anschließende Sequenzanalyse zeigte eindeutige Homologien (ca. 60%) zum oben beschriebenen 478 bp großen DNA-Fragment aus *M. truncatula*.

Der Einsatz des *GenomeWalker*TM-Systems (2.2.4.) auf Ebene genomischer DNA ermöglichte in der Folge die Verlängerung der erhaltenen Fragmente aus *V. faba* und *M. truncatula* sowohl in 5`- als auch in 3`-Richtung. Nach anschließender Sequenzanalyse konnten weitere Peptidsequenzen der 70 kDa großen Untereinheit von *V. faba*-Forisomen auf den klonierten Fragmenten gefunden werden. Dies bestätigte, dass es sich tatsächlich um den Abschnitt eines der Forisomen-Gene handelt. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die beiden Klone aus *V. faba* und *M. truncatula* homologe Gene beider Arten darstellen.

Durch einen erneuten Sequenzabgleich der klonierten DNA-Fragmente, sowohl mit der NCBI- (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) als auch der Medicago-Datenbank, konnte der gesamte genomische Klon sowie Teilbereiche dieser Sequenz auf cDNA-Ebene gefunden werden. Darüber hinaus konnten zwei weitere genomische Klone sowie die zugehörigen cDNA-

Fragmente von *M. truncatula* mit signifikanten Sequenz-Homologien identifiziert werden, die auf das Vorhandensein einer Genfamilie schließen lassen.

Zusammenfassend resultierten die ermittelten Sequenzdaten in drei genomischen Klonen von *M. truncatula* und einem ca. 2 kb umfassenden DNA-Fragment von *V. faba*. Diese Ergebnisse sowie das Vorhandensein einer EST-Datenbank führten zu dem Entschluss, die in der Folge beschriebenen Experimente zur molekularen Charakterisierung der Forisome am Beispiel von *M. truncatula* durchzuführen. Als Voraussetzung dafür sollte jedoch mittels RT-PCR überprüft werden, ob es sich bei den gefundenen genomischen Klonen um aktive Gene handelt.

3.1.3. Charakterisierung der Forisomen-Gene aus *M. truncatula*

Nach Präparation von Gesamt-RNA aus *M. truncatula* wurden unter Verwendung spezifischer Oligonukleotide mittels RT-PCR drei ca. 2 kb große DNA-Fragmente mit offenen Leserastern (ORF) amplifiziert (Abb. 5) und kloniert. Im Anschluss an die automatische Sequenzanalyse wurden die drei ermittelten, vermutlich Forisomen-spezifischen Gene aus *M. truncatula* als *mfor_1*, *mfor_2* und *mfor_3* bezeichnet.

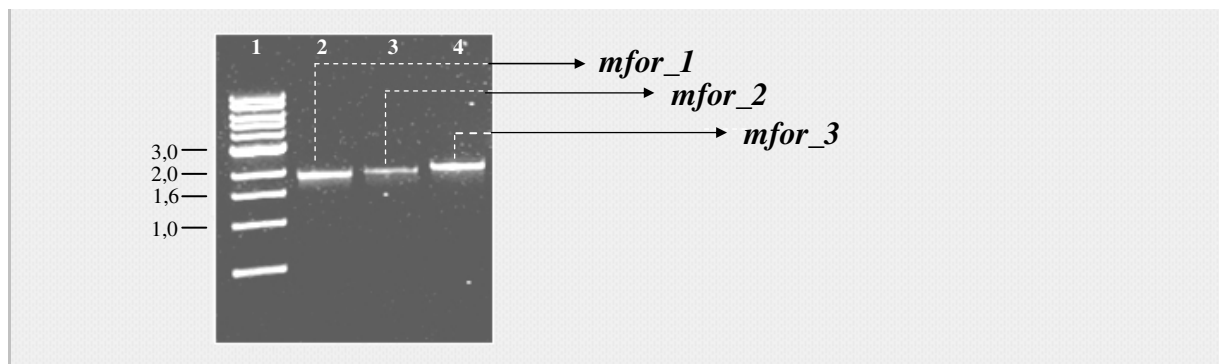


Abb. 5: Gelelektrophoretische Auftrennung der RT-PCR von *mfor_1*, *mfor_2* und *mfor_3*

Spur 1: 1 kb-DNA-Größenmarker (Invitrogen). **Spur 2:** 1889 kb-Fragment (*mfor_1*), **Spur 3:** 2025 kb-Fragment (*mfor_2*), **Spur 4:** 2100 kb-Fragment (*mfor_3*)

Mit Hilfe der RT-PCR konnte somit nachgewiesen werden, dass es sich in allen drei Fällen um aktive Gene handelt. Die Aminosäuresequenzen der drei Forisomen-Gene wurden auf homologe Bereiche und Sequenzmotive untersucht und sind nachfolgend dargestellt (Abb. 6).

```

1                                     50
MFOR1 ~~~~~~ ~~~~~~ MSLSNGTKLP NPFDLDESQI LDKVYLTHLH
MFOR2 MSTALSYNVP ISGTTTQKND TSQQQKSQLP NPFKLEDIEI LNKVYLTHVN
MFOR3 ~~~~~~MSSS MAPSSLVSNV SAYSQQAKTS NPLAWSDDKI LETVYLTHVH

51                                     100
MFOR1 DDDKCDKDV L FHILSNVI.L RTRLA.....E SRA...EFEP
MFOR2 DNMKYDRDTL FNLVSNIIISA STQTS.....GTNSGL.N TQI...SFKP
MFOR3 TGERYDVESL FNLTSNILKR STAVADSVAS KTGTPVGLVE DRLPLTGYEP

101                                    150
MFOR1 EFRTLKLISC QMITTPRGER YVHQTTMWIL QQLKTYSWDA KALIALAAFT
MFOR2 DFSVLKRISR QMITTRGTAE CAHQTTMWVL HHLRGFSWEA KALITLAAFS
MFOR3 PIRKLKHISA QMMSTLPGEH HAHMTTMSIL DQLKSHTWDG KAIFALAAFS
                                         PEP

151                                    200
MFOR1 LEYGNLLYL T ETSTSSDQLV NSLKILNQIQ ....NRKVTV PATDLVELIM
MFOR2 LEYGAIMHLH RIQ.SSDTLG NSLKQLSQVQ ....FRKVPA DITELVTFL
MFOR3 LEYGNFWHLV QT.PSGDTLG RSLATMNRVQ SVDKNRQAIA DYNLSLVKNLL

201                                    250
MFOR1 DVLLHIHEWA TRSGVGYNTL DVPSLSDALQ DIPVAVYWII ASTVAATGN.
MFOR2 QVLQDIKTWA AWSAFGYDLD DVNSLPDAMQ WIPLVVYWTV ATIVACTGN.
MFOR3 FAVECITELE KLSTKGYEHK DVPALSEAMQ EIPVAVYWA IITAIICANHL

251                                    300
MFOR1 ..IIGVSD.. YTLSDFKEL NFDVSKLKEH LKLSKWQIDS VEEYLKRKKA
MFOR2 ..LVGISE.. HKLSDYVKSL SDVVKELRRH LKSCELEIGK IHENENLLKD
MFOR3 DLLFGDSDDR YELSNDVVKL ASIVSKLKAH LTRSRKHIGE LEDYWRKRKV

301                                    350
MFOR1 ISNPKDII.. .....DIEVF KDKYVLLFIS
MFOR2 SDNIKDVFVAF LRLLIKNGT DQIPPIFIGN DQVKTGIEVF KKKHVLLFVS
MFOR3 LQTPTEIVEV LKVLVFHNEI .QDPLVEDGL NRQMVSIIEVF RKKHVLFIS
                                         PEP
                                         PEP

351                                    400
MFOR1 SLNKVDDEIL LLNSIHDR LQ DNPQ.VIKG. YKKEDFKILW IPI...WDVD
MFOR2 GLDTLRDEIL LLNSIYKRLQ DKPQEV LKGS FKKEDFKILW IPIVKNWD.E
MFOR3 GLDSIRDEIR LLQSIYVGLQ EEPRE.LKG. YRKEDFKILW IPIVDDWTLL
                                         PEP
                                         PEP 5

401                                    450
MFOR1 DQKIKFDSLK NKIRFYAVDY FSELPGIRLI REHLNY..SD KPIVPVLSPL
MFOR2 DRKKEFKNLK ESMKWYVLEH FFELPGRGII KKKLNYDIGY PPILAVINPQ
MFOR3 .HKA EFDNLK LEMPWYVVEY FYPLAGIRLI REDLSYK..N KPILPVLNPL

451                                    500
MFOR1 GEKMND DAMD LIFQWGIDAL PFRKQDGYDL TQKWKFWFDV TKRVNLGIQ.
MFOR2 GDIINKDAME IIFQWGIDAF PFRISDAEDI FKKWEWFWKL MKKVDVNI EK
MFOR3 GRIVNHNAMH MIFVWGIDAF PFRPTDDESL TQKWNWFWAE MKKVYPRLQD

501                                    550
MFOR1 .VKGDRYIFI YGGSDKKWIQ DFTLAL EKT RHEITLRADA IIEHYHLGKD
MFOR2 .MSWDRYIFI YGGNDPKWIQ DFTRAIGSIK KHQTIQNV DV NIDYHQLGKN
MFOR3 LIKGDTFIFI YGGTDPKWITQ DFALAI EKIK RHEITRKADA VIEHFHFGE
                                         PEP 6

551                                    600
MFOR1 DPKIVPRFWI EIES..KRL. .KKHQDGIDC EIQDIVKSLL CLKQDPQGWV
MFOR2 NPTEIPYFWM GIDG..RKQO NKTCKDSVDC EIQTAVKKLL CLKQDPLGWV
MFOR3 DKRIVPRFWI GIESLFANMI QKKHKDPTID EI....KSL L CLKQDQPGWV
                                         PEP 7

```

```

        601                                     650
MFOR1  ILTKGYNVKL LGHGEPMYQT LADFDIWKDR VLQKEGFDIA FKEYYDTKVK
MFOR2  LLSRGRHVTV FGHGEPMYQT VADFDKWKNN VVEKESFDEA FKEYYDTKLS
MFOR3  LLSKGPNVKL LGRGDQMYAT AVDFEIWKEK VLEKVGFDVA FKEYYERKRR
      └──┬──────────┘ └──PEP 8──┘
        651                                     700
MFOR1  DTYVKQPC+EI INV+DN+NINGN VIATIS+CPNP TCGRVMEVSS VNYK+CH+RDD
MFOR2  EISSSAS+CAV NSSD..... VLATIT+CPNP FCGRVMEVTS VNYK+CH+RDD
MFOR3  EYPV...ACAN MQL.ANYP+SD ILDPIY+CPDS NCGRSMETAS VSYK+CH+...
      └──PEP 9──┘ └──PEP 10──┘

        701                                     723
MFOR1  AAPQNGKI~ ~~~~~~ ~~~~
MFOR2  ...PDSCCI~ ~~~~~~ ~~~~
MFOR3  GHTHENAEVA PAESGGFVQI EKR

```

Abb. 6: Sequenzvergleich der drei Forisomen-Gene aus *M. truncatula* hinsichtlich ihrer Homologie

- Homologe Bereiche aller drei Gene sind gelb hinterlegt
- Auffällige Cystein-Abfolge aller drei Gene ist rot gekennzeichnet
- Das *coiled coil* Motiv in MFOR_2 ist blau gekennzeichnet
- Die in Tabelle 1B (S.38) aufgeführten Peptidsequenzen (PEP) werden durch Klammern angezeigt

Die computergestützte Sequenzanalyse (2.2.5.) der drei Forisomen-Gene zeigt, dass es sich um eine Genfamilie handelt, deren Vertreter *mfor_1*, *mfor_2* und *mfor_3* auf Aminosäure-Ebene eine ca. 50%ige Homologie aufweisen. Die aufgrund der Kalzium-Reaktion der Proteinkomplexe nahe liegende Vermutung, dass eines oder mehrere der identifizierten Forisomen-Gene ein für Ca^{2+} -bindende Proteine typisches EF-Hand-Motiv aufweisen, konnte nach Motiv-Suche mittels des Computerprogramms InterProScan des *European Bioinformatics Institute* (www.ebi.ac.uk/InterProScan/) nicht bestätigt werden.

Allerdings wurde für MFOR_2 ein *coiled coil* Motiv (Abb. 7 A) unter Verwendung des Paircoil Programms (<http://theory.lcs.mit.edu/multicoil/>; Wolf *et al.*, 1997) und die Ausbildung einer amphipatischen α -Helix nachgewiesen (Abb. 7 B; Accelrys SequWeb Vers. 2; siehe 2.2.5.), die in Abb. 6 blau markiert ist und nachfolgend noch einmal aufgeführt wurde.

ist. Trotz dieser Unregelmäßigkeiten zeigt Abb. 7 B eindeutig die Ausbildung einer amphipatischen Helix für diese Aminosäurekette, mit nur zwei hydrophoben Aminosäuren, die den hydrophilen Teil unterbrechen.

Zusammenfassend werden charakteristische Daten bezüglich der Forisomen-Gene in Tabelle 1A aufgeführt. Die in Abschnitt 3.1.2.1. erwähnten Peptidsequenzen und deren Homologie zu der Aminosäuresequenz der Forisomen-Untereinheiten MFOR_1, MFOR_2 und MFOR_3 sind in Tabelle 1B angegeben.

A	<i>mfor_1</i> / MFOR_1	<i>mfor_2</i> / MFOR_2	<i>mfor_3</i> / MFOR_3
Anzahl d. Basenpaare	1889	2025	2100
Anzahl der Aminosäuren	622	675	700
Molekulargewicht d. Proteine	72 kDa	77 kDa	80 kDa
mgl. Phosphorylierungsstellen	19	20	21
mgl. Glykosylierungsstellen	2	4	2
Isoelektrischer Punkt	6,36	7,30	6,95
Homologie der Aminosäure-Sequenz zu MFOR_1	--	53%	51%
Homologie der Aminosäure-Sequenz zu MFOR_2	--	--	44%
Bekannte Motive	--	<i>coiled coil</i> Motiv	--

B	Homologie der Peptidsequenzen zu:		
Peptidsequenzen	MFOR_1	MFOR_2	MFOR_3
1) ILQQLR	83%	33%	67%
2) TGIEVFK	71%	100%	57%
3) VSVEVFK	57%	57%	71%
4) LLNSINDR	88%	75%	50%
5) LQDNPQEVK	89%	80%	56%
6) QDFTLA	100%	83%	83%
7) QGWVILSK	87%	75%	87%
8) EGFDAIFK	100%	75%	75%

Tabelle 1A: Zusammenfassung charakteristischer Daten bezüglich der Forisomen-Gene

Tabelle 1B: Homologie der einzelnen Peptidsequenzen (in % identische Aminosäuren) zu den Forisomen-Untereinheiten MFOR_1, MFOR_2 und MFOR_3.

Die jeweils stärkste Homologie ist hervorgehoben

Die Analyse der drei Forisomen-Gene *mfor_1*, *mfor_2* und *mfor_3* zeigte, dass die jeweiligen ORFs für Proteine mit Molekulargewichten von 70 kDa, 72 kDa und 80 kDa kodieren. Das Bandenmuster der SDS-PAGEs aufgetrennter *V. faba*-Forisome (Abb. 4 C) lässt allerdings in diesem Bereich nur auf zwei Proteine (Abb. 4 C, Bande a und b) schließen.

3.1.4. Ca^{2+} -induzierte Auftrennung der *V. faba*-Forisome mittels SDS-PAGE

Die computergestützte Motivsuche ergab für keines der drei Forisomen-Proteine ein typisches Ca^{2+} -Bindungsmotiv. Da es sich bei den Forisomen aber um kalzium-reaktive Proteinkomplexe handelt, wurde ein *mobility-shift-assay* (2.2.3.) zur Identifizierung einer oder mehrerer kalzium-reaktiver Untereinheiten durchgeführt. Die Auftrennung der Forisome erfolgte zu diesem Zweck über eine 7%ige SDS-PAGE mit einer Endkonzentration von 2 mM CaCl_2 in der Gelmatrix. Forisome und Proteinmarker wurden gemischt und in einer Spur aufgetragen, um eventuelle Veränderungen des Laufverhaltens der einzelnen Untereinheiten besser detektieren zu können (Abb. 8 B). Als Referenz diente ein Ca^{2+} -freies SDS-PAA-Gel, wobei auch hier Forisome und Proteinmarker in einer Spur liefen (Abb. 8 A).

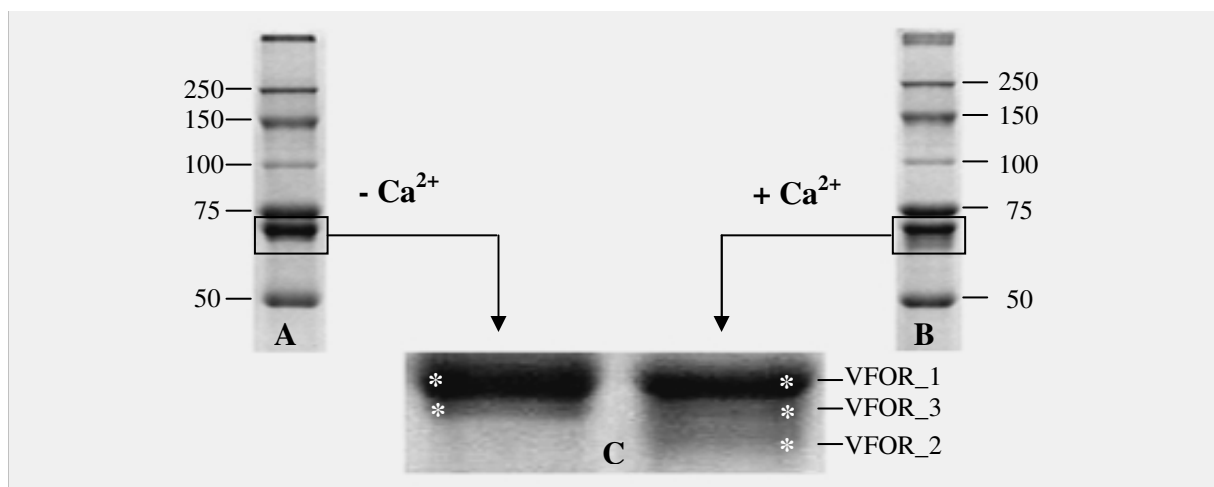


Abb. 8: Auftrennung der Forisome aus *V. faba* in Ca^{2+} -freien und Ca^{2+} -haltigen SDS-PAA-Gelen

(A) 7%iges SDS-PAA-Gel ohne CaCl_2 : ca. 5 μg aufgereinigte Forisome + 5 μl Proteinstandard in einer Spur

(B) 7%iges SDS-PAA-Gel mit 2 mM CaCl_2 : ca. 5 μg aufgereinigte Forisome + 5 μl Proteinstandard in einer Spur

(C) Ausschnittsvergrößerung beider Gele im Bereich von 50-75 kDa; Markierung (Stern) und Bezeichnung der Untereinheiten der Forisome aus *V. faba*

Neben den bereits beschriebenen Proteinbanden (siehe a, b, c, d in Abbildung 4C) konnte mittels der Ca^{2+} -haltigen SDS-PAA-Gele eine zusätzliche UE der Forisome aus *V. faba* bei ca. 65 kDa identifiziert werden. Das Bandenmuster der Ausschnittsvergrößerung (Abb. 8 C) lässt vermuten, dass die zusätzliche Untereinheit nach Zugabe von Ca^{2+} aus der Hauptbande ausläuft. Basierend darauf werden die UE der Forisome aus *V. faba* in der Folge als

- VFOR_1 (Abb. 4C b; Hauptbande bei ca. 70 kDa)
- VFOR_3 (Abb. 4C a; kleinere, schwächere Bande bei ca. 70 kDa)
- VFOR_Dim (Abb. 4C c; Bande bei ca. 130 kDa)
- VFOR_Mul (Abb. 4C d; Banden zwischen 200-350 kDa) und
- VFOR_2 (Abb. 8C, Bande bei ca. 65 kDa) bezeichnet.

Die Kalzium-Reaktivität der Untereinheit VFOR_2 resultiert in einem veränderten Laufverhalten in der SDS-PAGE und ermöglicht damit ihre Auftrennung.

Wesentlich deutlicher konnte die Kalzium-Reaktion von VFOR_2 nach Durchführung einer zweidimensionalen SDS-PAA-Gelelektrophorese (Abb. 9; Kameshita und Fujisawa, 1997) gezeigt werden, wobei eine Dimension unter Einfluss von EDTA, die andere hingegen unter Ca^{2+} durchgeführt wurde (2.2.3.). Das unterschiedliche Laufverhalten Ca^{2+} -bindender Proteine im Unterschied zu nicht Ca^{2+} -bindenden Proteinen in An- und Abwesenheit von Ca^{2+} ermöglicht ihre Identifizierung. Möglicherweise resultiert das veränderte Laufverhalten in einer Ca^{2+} -induzierten Konformationsänderung der Proteine, die in Anwesenheit des Chelators EDTA im SDS-PAA-Gel nicht erfolgen kann. Daher diente die Gelelektrophorese mit EDTA in beiden Dimensionen als Kontrolle.

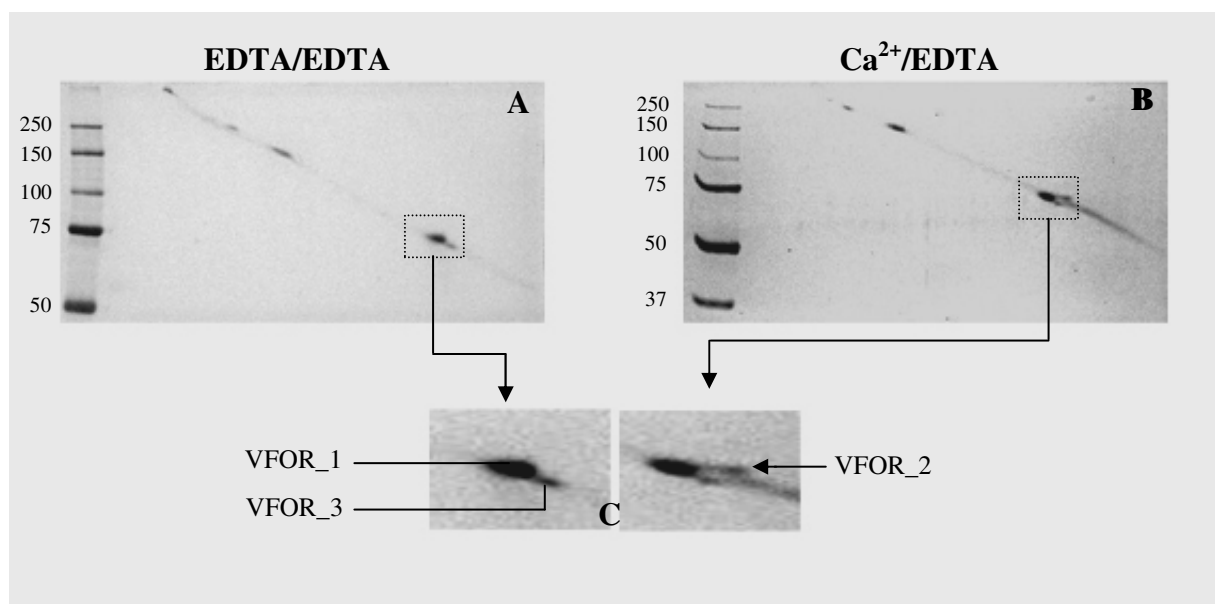


Abb. 9: 2D-SDS-PAA-Gelelektrophorese zur Detektion Ca^{2+} -reaktiver Proteine

(A) SDS-PAA-Gelelektrophorese mit 2 mM EDTA im 10%igen SDS-PAA-Gel der

1. Dimension und 2 mM EDTA im SDS-PAA-Gel der 2. Dimension

(B) SDS-PAA-Gelelektrophorese mit 2 mM CaCl_2 im 10%igen SDS-PAA-Gel der

1. Dimension und 2 mM EDTA im SDS-PAA-Gel der 2. Dimension

(C) Ausschnittsvergrößerung beider Gele im Bereich um 75 kDa; Markierung (Pfeil)

der Ca^{2+} -reaktiven UE VFOR_2 der Forisome aus *V. faba*

In (A) und (B) wurden jeweils 7 μg aufgereinigte Forisome aus *V. faba*, versetzt mit 6 μg poly(Glu, -Lys, -Tyr)_{6:3:1}, in eine Spur der 1. Dimension aufgetragen.

Diese Versuche konnten zeigen, dass am Aufbau der Forisome von *V. faba* nicht – wie anfänglich angenommen – zwei, sondern mindestens drei Untereinheiten mit Molekulargewichten von ca. 70 kDa beteiligt sind. Für eine dieser Untereinheiten, bezeichnet mit VFOR_2, konnte darüber hinaus eine Kalzium-Reaktion nachgewiesen werden. Die Bezeichnung „Kalzium-Reaktion“ anstelle von „Kalzium-Bindung“ wurde bewusst gewählt, da die Zugabe des CaCl_2 in den Probenpuffer und parallel dazu die Verwendung eines Ca^{2+} -freien Gelsystems nicht in einer Auftrennung der drei Untereinheiten resultierte. Dies deutet darauf hin, dass VFOR_2 lediglich in der Lage ist, auf Ca^{2+} – womöglich mit einer Konformationsänderung – zu reagieren, nicht aber, es fest zu binden.

3.1.5. Auftrennung der *C. gladiata*-Forisome in ihre Untereinheiten

Parallel durchgeführte Studien an weiteren Fabaceen ermöglichten im Falle von *C. gladiata* eine wesentlich effizientere Aufreinigung der Forisome aufgrund schnelleren Wachstums der Pflanze und deutlich größerer Proteinkörper. Die Auftrennung dieser Forisome mittels SDS-PAGE (Abb. 10) ließ zunächst vermuten, dass es sich hierbei um aus lediglich einer ca. 70 kDa großen Untereinheit bestehende Proteinkomplexe handelt. Die schwanzartigen Fortsätze der Forisome dieser Gattung könnten die zwei weiteren, allerdings sehr schwachen Proteinbanden bei ca. 55 kDa erklären (Abb. 10A). Kontaminationen sind aber auch hier nicht vollständig auszuschließen. Darüber hinaus konnte – wie auch bei *V. faba*-Forisomen – eine weitere, allerdings viel schwächere Bande bei 130 kDa beobachtet werden, die in Analogie zu VFOR_Dim in der Folge als CFOR_Dim bezeichnet wird. Hingegen waren im Bereich von 200-350 kDa – im Gegensatz zur Auftrennung von *V. faba*-Forisomen – keine Banden erkennbar.

Unter Berücksichtigung folgender Ergebnisse erfolgte auch für *C. gladiata*-Forisome die Durchführung eines *mobility shift assay*:

- Die Auftrennung der *V. faba*-Forisome resultiert in drei Untereinheiten nach Zugabe von Ca^{2+} ins SDS-PAA-Gel.

und

- Für *M. truncatula* konnten drei Gene kloniert werden, die für ca. 70 kDa große Proteine kodieren.

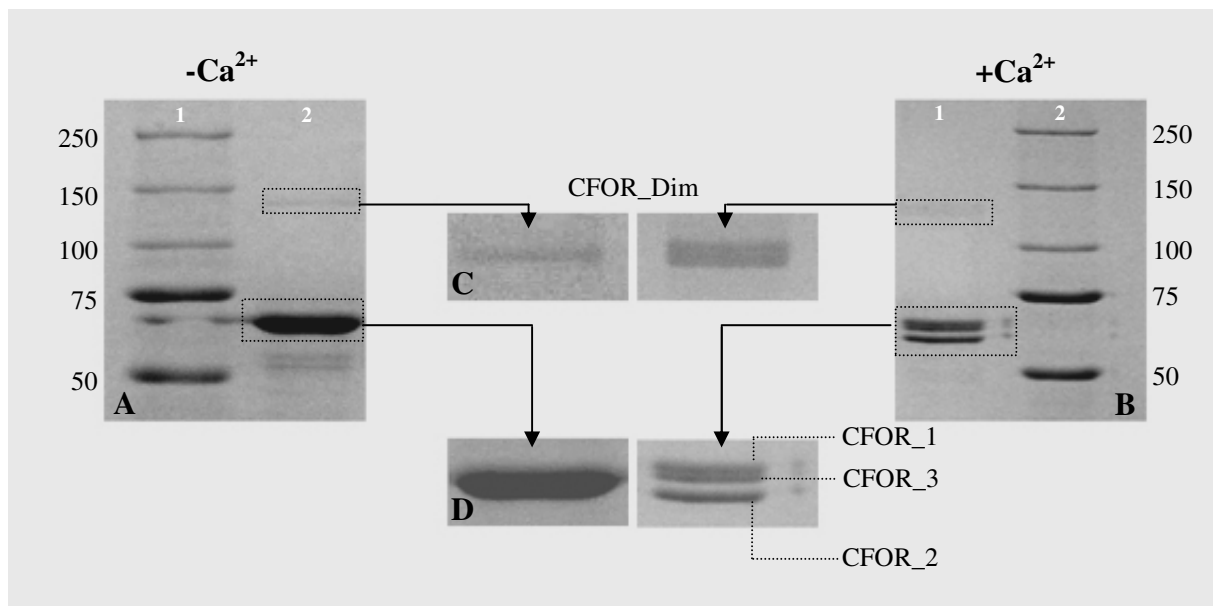


Abb. 10: Auftrennung der Forisome aus *C. gladiata* in Ca^{2+} -freien und Ca^{2+} -haltigen SDS-PAA-Gelen

(A) 7%iges SDS-PAA-Gel ohne Ca^{2+} : **Spur 1:** 5 μl Proteinstandard; **Spur 2:** 7 μg aufgereinigte Forisome

(B) 7%iges SDS-PAA-Gel mit 2 mM Ca^{2+} : **Spur 1:** ca. 5 μg aufgereinigte Forisome; **Spur 2:** 5 μl Proteinstandard

(C) Ausschnittsvergrößerung beider Gele im Bereich um 130 kDa. Im Ca^{2+} -haltigen Gel erfolgte die Auftrennung von CFOR_Dim in 3 Banden.

(D) Ausschnittsvergrößerung beider Gele im Bereich zwischen 50 und 75 kDa; Bezeichnung der Untereinheiten der *C. gladiata*-Forisome.

So zeigte das Bandenmuster Ca^{2+} -haltiger Gele (Abb. 10 B), dass auch die Forisome von *C. gladiata* aus mindestens 3 Untereinheiten aufgebaut sind, wobei die Proteinbanden im Vergleich zu denen der *V. faba*-Forisome wesentlich deutlicher erscheinen. Die Bezeichnung der drei Proteine mit CFOR_1, CFOR_2 und CFOR_3 erfolgte analog zur Benennung der

Forisomen-Untereinheiten von *V. faba*. Die Ca^{2+} -induzierte Veränderung des Laufverhaltens von CFOR_2 ermöglichte eine Separierung und damit auch eine optische Trennung von CFOR_1 und CFOR_3 (Abb. 10 B, Ausschnittsvergrößerung). Parallel dazu konnte im Ca^{2+} -Gel im Bereich von ca. 130 kDa eine Auftrennung von CFOR_Dim in ebenfalls drei Banden erreicht werden, was nahe legt, dass es sich tatsächlich um Dimerisierungsderivate der kleineren, ca. 70 kDa großen Untereinheiten handelt.

Die Ca^{2+} -reaktive Untereinheit CFOR_2 konnte mittels der Ca^{2+} -Gele gut aufgetrennt werden, so dass eine Generierung von Peptidsequenzen gegen diese Untereinheit möglich war. Allerdings konnten nur zwei der erhaltenen Peptidsequenzen den ermittelten Genen zugeordnet werden, die darüber hinaus aus homologen Bereichen aller drei Gene stammen. Beide Peptide sind in Abb. 6 als „Pep 9“ und „Pep 10“ bezeichnet und ihre Homologie zu den Aminosäuresequenzen der drei Gene nachfolgend aufgeführt (Tab. 2).

Homologie der Peptidsequenzen zu:			
Peptidsequenzen	MFOR_1	MFOR_2	MFOR_3
9) ESFDVAFK	75%	87%	75%
10) VMEVTSLNKY	75%	87%	75%

Tabelle 2: Homologie der Peptidsequenzen der Ca^{2+} -reaktiven Untereinheit (in % identische Aminosäuren) MFOR_1, MFOR_2 und MFOR_3.

Die jeweils stärkste Homologie ist hervorgehoben

Aus Tabelle 2 wird ersichtlich, dass aufgrund der Homologie die Untereinheit CFOR_2 dem Gen *mfor_2* zuzuordnen wäre. Allerdings muss darauf hingewiesen werden, dass es sich um Peptidsequenzen einer Untereinheit der *C. gladiata*-Forisomen handelt, während die Gene auf Basis von *M. truncatula*-DNA kloniert wurden. Der Sequenzunterschied der beiden Arten verhindert somit die eindeutige Zuordnung der Untereinheit CFOR_2 zu einem der Gene *mfor_1*, *mfor_2* und *mfor_3*.

Es konnte somit eindeutig gezeigt werden, dass sich die Forisome von *V. faba* und *C. gladiata* mittels SDS-PAGE im Bereich von 70 kDa nach Zugabe von Ca^{2+} in drei Untereinheiten auftrennen. Darüber hinaus codieren die drei ermittelten Gene *mfor_1*, *mfor_2* und *mfor_3* für drei Proteine mit Molekulargewichten zwischen 70 kDa und 80 kDa.

Die Zuordnung mehrere Peptide der 70 kDa-Untereinheit der Forisome zu den drei ermittelten Genen legte nahe, dass es sich tatsächlich um Forisomen-spezifische Gene handelt. Nach Expression der Gene *mfor_1*, *mfor_2* und *mfor_3* in *E. coli* sollten Antikörper

gegen die einzelnen überexprimierten Proteine hergestellt werden. Die Reaktion dieser Antikörper gegen aufgereinigte und über SDS-PAGE aufgetrennte Forisome sollte nachweisen, dass es sich tatsächlich um Forisomen-spezifische Gene handelt. Eventuell wäre unter Verwendung dieser Antikörper auch eine Zuordnung der einzelnen Banden im Gel zu den Genen möglich.

3.2. EXPRESSION DER FORISOMEN-GENE *mfor_1*, *mfor_2* UND *mfor_3* IN *E. COLI*

Die Subklonierung der Forisomen-Gene *mfor_1*, *mfor_2* und *mfor_3* erfolgte über die *Sma*I-Restriktionsschnittstellen in den bakteriellen Expressionsvektor pGEX3 (2.1.2.2.). Die Forisomen-Untereinheiten wurden als Fusionsproteine mit der 27,5 kDa großen Glutathion-S-Transferase (GST) in *E. coli* BL21 exprimiert (Abb. 11 A). Dieses System ermöglichte die Herstellung ausreichender Mengen MFOR_1- (ca. 90 kDa) und MFOR_2- (ca. 95 kDa) Fusionsprotein zur Erzeugung polyklonaler Antikörper in Kaninchen. Die Expression von GST-MFOR_3 resultierte lediglich in geringen, für die Antikörperproduktion unzureichenden Protein-Mengen. Allerdings konnte mittels Western-Blot-Analyse unter Verwendung eines monoklonalen GST-Antikörpers (2.2.7.) neben den Produkten GST-MFOR_1 und GST-MFOR_2 auch die Expression für GST-MFOR_3 (ca. 100 kDa) im bakteriellen System eindeutig nachgewiesen werden (Abb. 11 B).

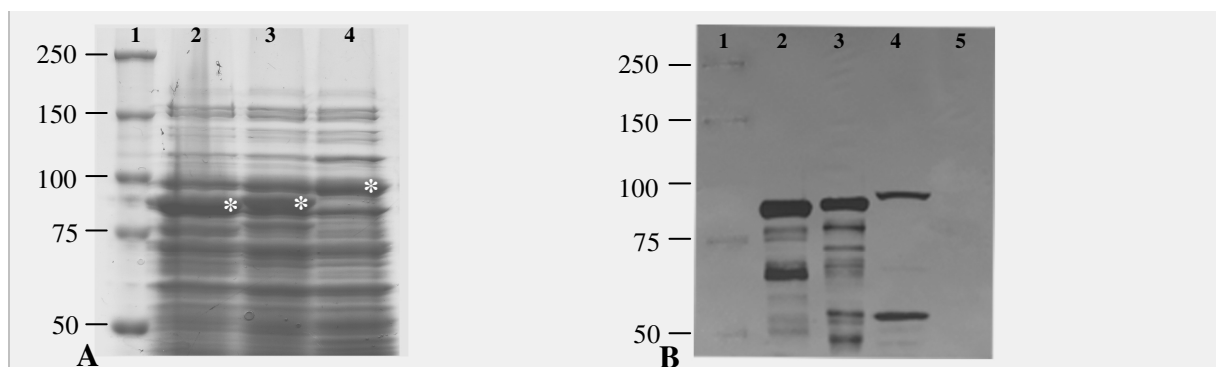


Abb. 11: Überexpression der Fusionsproteine GST-MFOR_1, GST-MFOR_2 und GST-MFOR_3, sowie deren Nachweis mittels GST-Antikörper

(A) 7%iges SDS-PAA-Gel der überexprimierten Fusionsproteine nach Coomassie Brilliant Blue-Färbung. **Spur 1:** Proteinstandard, **Spur 2:** Gesamt-Protein-Extrakt aus *E. coli* mit überexprimiertem Fusionsprotein GST-MFOR_1 (ca. 90 kDa; markiert durch Stern),

Spur 3: Gesamt-Protein-Extrakt aus *E. coli* mit überexprimiertem Fusionsprotein GST-MFOR_2 (ca. 95 kDa; Stern), **Spur 4:** Gesamt-Protein-Extrakt aus *E. coli* mit überexprimiertem Fusionsprotein GST- MFOR_3 (ca. 100 kDa; Stern).

(B) Western-Blot-Analyse der überexprimierten Fusionsproteine aus Abb. 11 A und Detektion derselben unter Verwendung des GST-Antikörpers aus Maus.

Spur 1-4: Ladeschema identisch zu Abb. 11A. **Spur 5:** Gesamt-Protein-Extrakt aus *E. coli* als Negativ-Kontrolle

Die Aufreinigung der Fusionsproteine aus dem bakteriellen Gesamt-Protein-Extrakt durch Affinitätschromatographie (2.2.6.1.) resultierte in quantitativen Verlusten der rekombinanten Forisomen-Untereinheiten. Eine anschließende Abspaltung der GST durch den Faktor Xa – ermöglicht durch die Verwendung des pGEX3-Systems – führte außerdem zu einer starken Degradation der Proteine. Aufgrund dieser Verluste und der geringen Immunogenität der GST wurden die Banden der Fusionsproteine direkt aus dem SDS-PAA-Gel ausgeschnitten und zur Herstellung polyklonaler Antikörper in Kaninchen der Firma EUROGENTEC (Seraing, Belgien) übersandt. Darüber hinaus wurden für eine Western-Blot-Analyse der überexprimierten Fusionsproteine sowohl aufgereinigte und über die SDS-PAGE aufgetrennte Forisomen-Proteine aus *V. faba* (Banden bei ca. 70k Da in Abb. 4 C) als auch *C. gladiata* (Banden bei ca. 70 kDa in Abb. 10 A) aus der Gelmatrix isoliert und für die Produktion polyklonaler Antikörper in Maus durch die oben genannte Firma verwandt.

3.3. IMMUNOLOGISCHER NACHWEIS REKOMBINANTER UND NATIVER FORISOMEN -UNTEREINHEITEN MITTELS WESTERN-BLOT-ANALYSE

Die Herstellung polyklonaler Antikörper in Kaninchen und Mäusen durch die Firma EUROGENTEC – nach Entnahme des prä-immun-Serums – erfolgte mittels dreimaliger Immunisierung der Tiere im Abstand von 3 Wochen. Dafür wurden jeweils 100 µg Protein der rekombinant hergestellten Fusionsproteine (in Kaninchen) bzw. 10 µg Protein der 70 kDa großen Untereinheit der Forisome (in Mäusen) verwendet. Im Anschluss an jede der drei Immunisierungen wurde Antiserum entnommen. Sowohl das prä-immun- als auch die jeweiligen Immunseren wurden einzeln mittels Western-Blot-Analyse getestet.

anti-MFOR_1 Antikörper

Die Western-Blot-Analyse (2.2.7.) unter Verwendung des polyklonalen anti-MFOR_1 Antikörpers zeigte ein positives Signal bei ca. 90 kDa für das rekombinant hergestellte Fusionsprotein GST/MFOR_1 und ein, vermutlich auf Degradation hinweisendes, schwächeres Signal bei ca. 75 kDa (Abb. 12A; Spur 1). Eine Kreuzhybridisierung dieses Antikörpers mit der GST konnte nicht vollkommen ausgeschlossen werden, da eine schwache Reaktion gegen rekombinant hergestellte GST (Daten nicht gezeigt) und das rekombinante Fusionsprotein GST-MFOR_2 (Abb. 12 A, Spur 2) zu beobachten war. Aufgrund der geringen Überexpression von GST-MFOR_3 (Abb. 11 A und B) wurde die dreifache Menge des zugehörigen Gesamt-Protein-Extrakts aus *E. coli* für den Western-Blot eingesetzt. Daher könnte die Bande in Spur 3 der Abb. 12A eine unspezifische Bindung des Antikörpers an ein *E. coli*-Protein darstellen. Denkbar wäre auch hier eine Kreuzhybridisierung des anti-MFOR_1 Antikörpers mit einem Abbauprodukt des rekombinanten GST/MFOR_3, wobei jedoch das Bandenmuster des Western-Blots unter Verwendung des anti-GST-Antikörpers (Abb. 11B) nicht darauf hinweist.

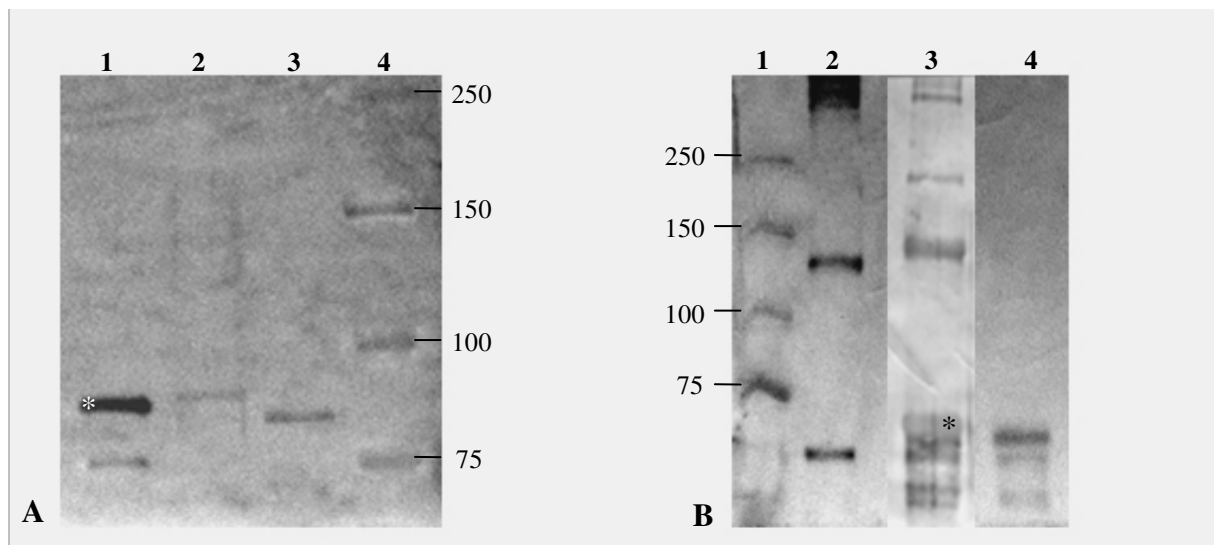


Abb. 12: Western-Blot-Analyse mittels des anti-MFOR_1-Antikörpers

(A) Detektion des überexprimierten Fusionsproteins GST/MFOR_1,

Spur 1: Gesamt-Protein-Extrakt aus *E. coli* mit überexprimiertem Fusionsprotein GST-MFOR_1 (ca. 90 kDa; mit Stern gekennzeichnet), **Spur 2:** Gesamt-Protein-Extrakt aus *E. coli* mit überexprimiertem Fusionsprotein GST-MFOR_2, **Spur 3:** Gesamt-Protein-Extrakt aus *E. coli* mit überexprimiertem Fusionsprotein GST-MFOR_3, **Spur 4:** Proteinmarker

(B) Detektion aufgereinigter Forisome

Spur 1: Proteinmarker, **Spur 2:** aufgereinigte Forisome aus *V. faba*, Antiserum nach erster Immunisierung, **Spur 3:** aufgereinigte Forisome aus *V. faba*, Antiserum nach dritter Immunisierung (Stern markiert Hauptbande, entspricht Bande b in Abb. 4C), **Spur 4:** aufgereinigte Forisome aus *C. gladiata*, Antiserum nach dritter Immunisierung

Die Detektion der *V. faba*-Forisome mittels des anti-MFOR_1-Antikörpers nach der ersten Immunisierung zeigt ein deutliches Signal bei ca. 65 kDa. Mit vergleichbarer Intensität werden auch die Proteine bei ca. 130 kDa und im Bereich von 300 kDa bis 350 kDa erkannt (Abb. 12, Spur 1). Es kann daher davon ausgegangen werden, dass es sich bei den größeren Proteinen – wie bereits vermutet – um Dimerisierungs- und Multimerisierungsderivate (VFOR_Dim und VFOR_Mul) der kleineren Untereinheiten handelt.

Die Western-Blot-Analyse unter Verwendung des Serums nach der dritten Immunisierung zeigt eine Reaktion des Antikörpers mit vier Proteinen im Bereich von ca. 70 kDa (Abb. 12 B, Spur 3). Die mengenmäßig stärkste Untereinheit (Stern in Abb. 12 B, siehe auch Bande b in Abb. 4C) aufgetrennter *V. faba*-Forisome wird durch den anti-MFOR_1-Antikörper unspezifisch erkannt, verdeutlicht durch eine relativ schwache, unscharfe Färbung dieser Bande.

Im Vergleich dazu werden nach Auftrennung von *C. gladiata*-Forisomen die Hauptbande bei ca. 70 kDa sowie zwei weitere, etwas schwächere Signale bei ca. 65 kDa und ca. 55 kDa detektiert. Bei langer Exposition (5 min) des Western-Blots kann auch bei *C. gladiata*-Forisomen die vermutliche Dimerisierungsbande (CFOR_Dim) bei ca. 130 kDa beobachtet werden, allerdings handelt es sich hierbei um ein sehr schwaches Signal.

Das prä-immun-Serum erkannte weder die rekombinanten Fusionsproteine noch die Proteine der aufgereinigten Forisome, auch nicht nach langer Exposition des Western-Blots (Daten nicht gezeigt).

Eine Western-Blot-Analyse von *M. truncatula*-Forisomen konnte nicht durchgeführt werden, da eine Aufreinigung der Proteinkörper aufgrund der Beschaffenheit dieser kleinen, krautigen Pflanze nicht möglich war.

anti-MFOR_2 Antikörper

Die Immunisierung eines Kaninchens mit dem rekombinant hergestellten Fusionsprotein GST-MFOR_2 resultierte in dem polyklonalen Antikörper anti-MFOR_2, der nach Western-Blot-Analyse der überexprimierten Fusionsproteine eindeutig sein Antigen detektierte (in

Abb. 13 A durch Stern markiert). Dagegen konnte unter Verwendung des prä-immun-Serums keine Reaktion beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Eine schwache Kreuzhybridisierung des anti-MFOR_2-Antikörpers mit der GST wird sowohl in der Detektion des Fusionsproteins GST-MFOR_1 (Spur 1) als auch des GST-MFOR_3 (Spur 3) ersichtlich. Des Weiteren erfolgte eine unspezifische Bindung des Antiserums an Proteine des bakteriellen Gesamtextraktes in der Spur des GST-MFOR_3, dessen geringe Expression den Einsatz der dreifachen Menge an Protein-Extrakt erforderte.

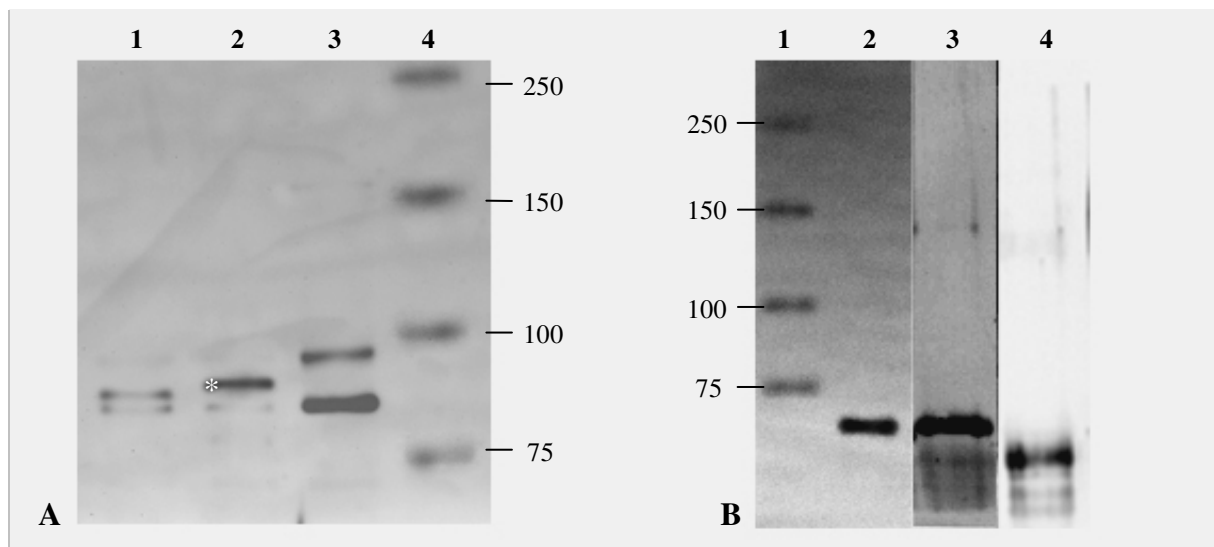


Abb. 13: Western-Blot-Analyse mittels des anti-MFOR_2-Antikörpers

(A) Detektion des überexprimierten Fusionsproteins GST/MFOR_2,

Spur 1: Gesamt-Protein-Extrakt aus *E. coli* mit überexprimiertem Fusionsprotein GST-MFOR_1, **Spur 2:** Gesamt-Protein-Extrakt aus *E. coli* mit überexprimiertem Fusionsprotein GST-MFOR_2 (ca. 95 kDa; mit Stern gekennzeichnet), **Spur 3:** Gesamt-Protein-Extrakt aus *E. coli* mit überexprimiertem Fusionsprotein GST-MFOR_3, **Spur 4:** Proteinmarker

(B) Detektion aufgereinigter Forisome

Spur 1: Proteinmarker, **Spur 2:** aufgereinigte Forisome aus *C. gladiata*, prä-immun-Serum, **Spur 3:** aufgereinigte Forisome aus *C. gladiata*, Antiserum nach dritter Immunisierung, **Spur 4:** aufgereinigte Forisome aus *V. faba*, Antiserum nach dritter Immunisierung

Die Auswertung der Western-Blot-Analyse der aufgereinigten und durch SDS-PAGE aufgetrennten Forisomen-Proteine von *C. gladiata* zeigte, dass bereits das prä-immun-Serum Antikörper gegen ein ca. 70 kDa großes Protein enthielt (Abb. 13 B, Spur 2). Dieser Antikörper des prä-immun-Serums – gegen entweder eine aufgereinigte Forisomen-UE oder ein ko-aufgereinigtes ca. 70 kDa großes Protein – verhinderte eine eindeutige Analyse der Detektion einzelner Untereinheiten der *C. gladiata*-Forisome durch den anti-MFOR_2-Antikörper. Allerdings erkannte der anti-MFOR_2-Antikörper im Vergleich zum prä-immun-Serum zusätzliche Proteine aufgetrennter *C. gladiata*-Forisome im Bereich von ca. 65 kDa (Abb. 13 B, Spur 3).

Im Gegensatz zu *C. gladiata*-Forisomen konnte keine Reaktion des prä-immun-Serums gegen aufgereinigte *V. faba*-Forisome beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Die Inkubation mit dem anti-MFOR_2-Antikörper zeigte dagegen ein deutliches Signal für eine ca. 65 kDa große Untereinheit der aufgetrennten *V. faba*-Forisome (Abb. 13 B, Spur 4), wie sie auch für *C. gladiata*-Forisome nach Inkubation mit dem Immuns serum beobachtet werden konnte. Somit konnte auch das *mfor_2*-kodierte Protein den Forisomen eindeutig zugeordnet werden.

Die Herstellung eines polyklonalen anti-MFOR_3-Antikörpers war aufgrund der geringen Ausbeute des in *E. coli* rekombinant hergestellten Proteins nicht möglich.

anti-can- und anti-vf-Antikörper

Nach Auftrennung der Forisome von *V. faba* und *C. gladiata* durch SDS-PAGE wurden jeweils die Banden bei ca. 70 kDa isoliert und für die Herstellung polyklonaler Antikörper in Mäusen an die Firma EUROGENTEC versandt. Das erhaltene polyklonale Serum gegen die UE aus *V. faba* wurde mit anti-vf-Antikörper und das polyklonale Serum die UE aus *C. gladiata* mit anti-can-Antikörper bezeichnet. Mit Hilfe dieser Antikörper sollte die Zugehörigkeit der rekombinant hergestellten Proteine MFOR_1, MFOR_2 und MFOR_3 zu den Forisomen – sozusagen als Rückreaktion zu den oben beschriebenen Antikörper-Analysen – gezeigt werden. Besonderes Augenmerk lag dabei auf der MFOR_3-Untereinheit, da eine ausreichende Expression im bakteriellen System und damit eine Antikörperherstellung für dieses Protein nicht möglich war. Somit konnte auch die Zuordnung dieser Untereinheit zu den Forisomen – analog zu der von MFOR_1 und MFOR_2 – auf diesem Weg nicht erfolgen.

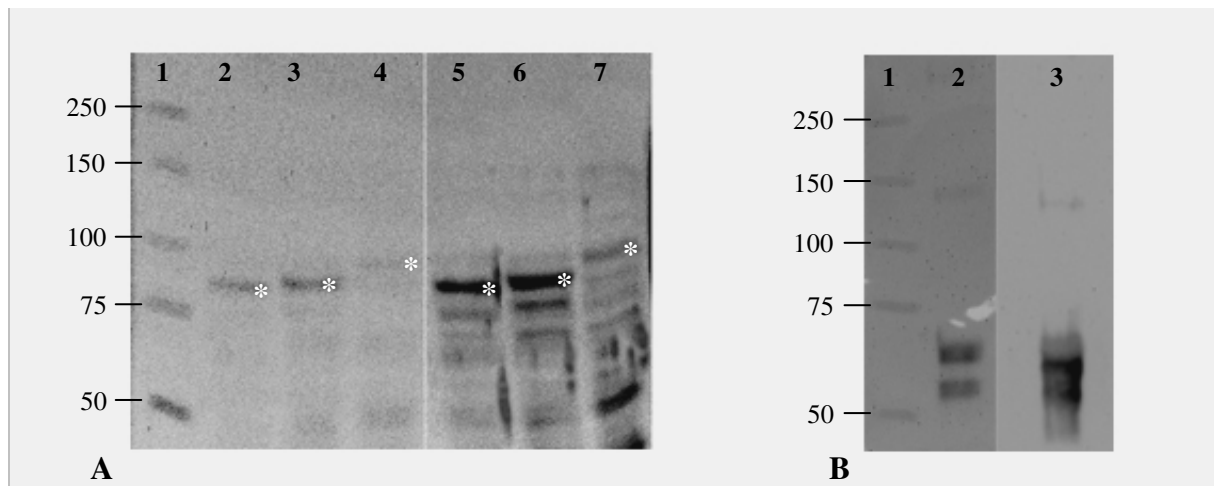


Abb. 14: Western-Blot-Analyse mittels der anti-vf bzw. anti-can Antikörper

(A) Detektion der überexprimierten Fusionsproteine (gekennzeichnet durch Stern), jeweils als Gesamt-Protein-Extrakt aus *E. coli* aufgetragen; **Spur 1:** Proteinmarker, **Spur 2:** GST-MFOR_1, anti-vf-Antikörper, **Spur 3:** GST-MFOR_2, anti-vf-Antikörper, **Spur 4:** GST-MFOR_3, anti-vf-Antikörper, **Spur 5:** GST-MFOR_1, anti-can-Antikörper, **Spur 6:** GST-MFOR_2, anti-can-Antikörper, **Spur 7:** GST-MFOR_3, anti-can-Antikörper

(B) Detektion aufgereinigter Forisome

Spur 1: Proteinmarker, **Spur 2:** aufgereinigte Forisome aus *V. faba*, anti-vf-Antikörper, **Spur 3:** aufgereinigte Forisome aus *C. gladiata*, anti-can-Antikörper

Die Western-Blot-Analyse unter Verwendung des anti-vf bzw. anti-can Antikörpers gegen die bakteriellen Gesamt-Protein-Extrakte der drei Überexpressionen zeigt jeweils ein Signal bei ca. 90 kDa (GST-MFOR_1), ca. 95 kDa (GST-MFOR_2) und ca. 100 kDa [GST-MFOR_3 (Abb. 14 A; jeweils durch Stern gekennzeichnet)]. Ein Vergleich dieses Bandenmusters mit dem des Western-Blots nach Detektion durch den monoklonalen GST-Antikörper (Abb. 11 B) beweist, dass es sich hierbei um die drei Fusionsproteine GST-MFOR_1, GST-MFOR_2 und GST-MFOR_3 handelt. Vergleicht man die Abbildungen 11 B (Spur 4) und 14 A (Spur 4 und 7) wird deutlich, dass beide Antikörper-Reaktionen gegen GST-MFOR_3 schwächer sind, entsprechend der geringen Expression dieses Proteins im bakteriellen System. Darüber hinaus konnte eine deutlichere Detektion der Fusionsproteine mittels des anti-can-Antikörpers im Vergleich zum anti-vf-Antikörper beobachtet werden.

Der Einsatz des anti-vf bzw. anti-can Antikörpers gegen das eigene Antigen (aufgereinigte und über SDS-PAGE aufgetrennte *V. faba*- bzw. *C. gladiata*-Forisome) diente als Kontrolle. Auffällig dabei ist die Reaktion des anti-vf-Antikörpers gegen aufgereinigte *V. faba*-Forisome

(Abb. 14 B; Spur 2), da auch hier – analog zum anti-MFOR_1-Antikörper (Abb. 12 B, Spur 3) – keine Detektion der Hauptbande bei ca. 70 kDa erfolgte, die für die Immunisierung verwendet wurde.

Zusammenfassend kann unter Berücksichtigung der beschriebenen Western-Blot-Analysen festgestellt werden, dass die Untereinheiten MFOR_1, MFOR_2 und MFOR_3 am Aufbau der Forisome beteiligt sind.

3.4. IMMUNOLOGISCHER NACHWEIS NATIVER FORISOME MITTELS CLSM

Die oben beschriebenen Experimente zeigen, dass die auf Basis der Gene *mfor_1*, *mfor_2* und *mfor_3* rekombinant hergestellten Proteine MFOR_1, MFOR_2 und MFOR_3 den Proteinbanden der SDS-PAGEs nach Auftrennung aufgereinigter Forisomen zugeordnet werden können. Letztlich sollte eine mögliche Reaktion der polyklonalen Antikörper anti-MFOR_1 bzw. anti-MFOR_2 gegen native Forisome die Zugehörigkeit der Untereinheiten MFOR_1 und MFOR_2 zu den Forisomen nachweisen. Die Produktion eines polyklonalen anti-MFOR_3-Antikörpers war aufgrund der schwachen Expression dieser Untereinheit im bakteriellen System nicht möglich.

Zu diesem Zweck wurden mittels Schnellaufreinigung (2.2.1.) isolierte, native *V. faba*-Forisome in Mikrotiterplatten überführt, mit den jeweiligen Antiseren inkubiert und anschließend durch CLSM analysiert (Abb. 15; 2.2.8.), ermöglicht durch die Verwendung eines fluoreszierenden anti-Kaninchen-Antikörpers. Native Forisome von *C. gladiata* konnten für dieses Experiment nicht verwendet werden, da in den unter 3.3. beschriebenen Western-Blot-Analysen eine Reaktion des prä-immun-Serums von anti-MFOR_2 gegen *C. gladiata*-Proteine zu beobachten war.

Bereits erste Western-Blot-Analysen unter Verwendung des anti-MFOR_1 Antikörpers zeigten eine starke Affinität des Immunsersums zu den über SDS-PAGE aufgetrennten Proteinen der Forisome aus *V. faba* (siehe Abb. 12 B). Aufgrund dessen wurde auch für die Immunofluoreszenz – analog zur Western-Blot-Analyse – eine Verdünnung des prä-immun- und des Immunsersums von 1:500 gewählt. Da die Bindung anti-MFOR_2 Antikörper an denaturierte Proteine der *V. faba*-Forisome im Verhältnis zum anti-MFOR_1-Antikörper etwas schwächer erschien, wurde dieses Immunsersum mit einer Verdünnung von 1:100 eingesetzt.

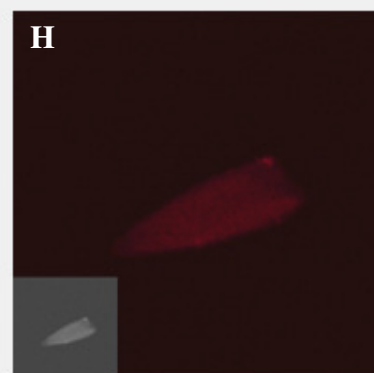
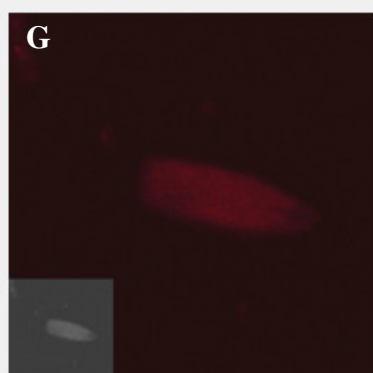
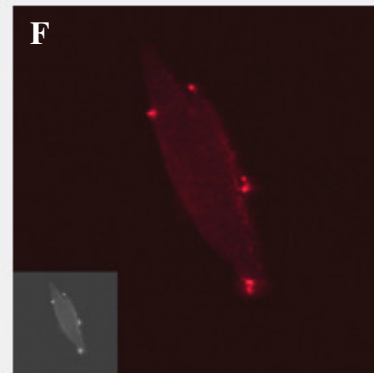
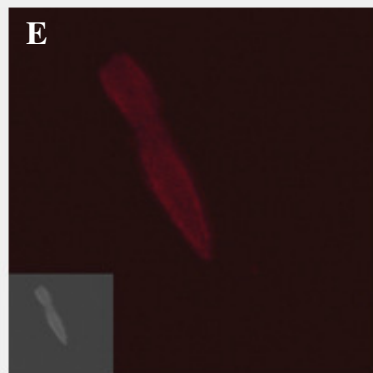
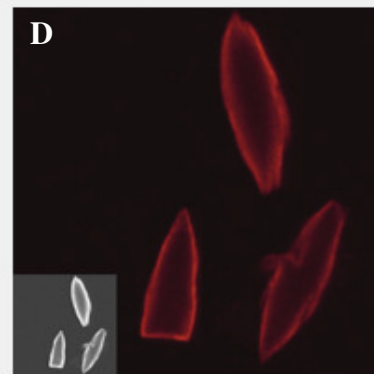
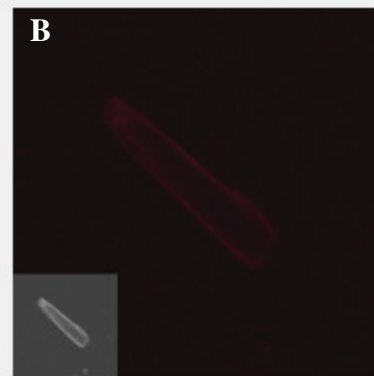
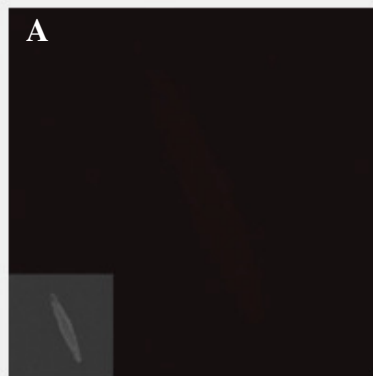


Abbildung 15: Detektion nativer Forisome mittels der polyklonalen Antikörper anti-MFOR_1 und anti-MFOR_2

- (A) Forisome der kondensierten Konformation nach Inkubation mit dem MFOR_1 - prä-immun-Serum
- (B) Forisome der kondensierten Konformation nach Inkubation mit dem anti-MFOR_1-AK
- (C) Forisome im Übergang zur dispergierten Konformation nach Inkubation mit dem MFOR_1 - prä-immun-Serum
- (D) Forisome im Übergang zur dispergierten Konformation nach Inkubation mit dem anti-MFOR_1-AK
- (E) Forisome der kondensierten Konformation nach Inkubation mit dem MFOR_2-prä-immun-Serum
- (F) Forisome der kondensierten Konformation nach Inkubation mit dem anti-MFOR_2-AK
- (G) Forisome im Übergang zur dispergierten Konformation nach Inkubation mit dem MFOR_2-prä-immun-Serum
- (H) Forisome im Übergang zur dispergierten Konformation nach Inkubation mit dem anti-MFOR_2-AK

Jeder Abbildung wurde eine verkleinerte, kontrastierte und falschfarbene Kopie beigelegt (linke untere Ecke) um die Lage und Form der Proteinkörper auch bei schwacher Fluoreszenz zu verdeutlichen.

Die Abbildungen 15 A, C, E und G zeigen, dass die Verwendung des jeweiligen prä-immun-Serums lediglich in einer schwachen Fluoreszenz der Forisome resultierte. Darüber hinaus konnte nach Inkubation der aufgereinigten Forisome mit Alexa Fluor[®] 488 goat-anti-rabbit IgG (2.2.8) als Kontrolle keinerlei Fluoreszenz beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Dagegen maskiert der anti-MFOR_1 Antikörper deutlich die äußeren Bereiche der Forisome (Abb. 15 D), sichtbar in einer vielfach stärkeren Fluoreszenz der Proteinkörper im Vergleich zu der nach Verwendung des prä-immun-Serums.

Bedingt durch die Inkubation der Proteinkörper in den für die Antikörper notwendigen Medien lagen nicht alle Forisome in ihrer kondensierten Form vor, sondern befanden sich zum Teil im Übergang zur dispergierten Konformation. Der Vergleich beider Zustände nach Immunodetektion durch den anti-MFOR_1-Antikörper zeigt, dass die Fluoreszenz intensiviert bei ansatzweise dispergierten Proteinkörpern auftritt, während die wenigen, noch vollkommen kondensierten Forisome wesentlich schwächer fluoreszieren (Abb. 15 B).

Nach Inkubation der Forisome mit dem anti-MFOR_2 Antikörper konnte keine signifikant stärkere Fluoreszenz der dispergierten Proteinkörper (Abb. 15 H) im Vergleich zur Fluoreszenz der dispergierten Forisome des prä-immun-Serums (Abb. 15 G) beobachtet werden. Allerdings zeigten Forisome der kondensierten Konformation nach Inkubation mit dem anti-MFOR_2-Antikörper häufig starke, punktuelle Signale (Abb. 15 F). Diese Fluoreszenz trat dabei gehäuft an Stellen der Proteinkörper auf, wo faserartige Strukturen der Forisome aufgrund mechanischer Einflüsse während der Aufreinigung partiell abgelöst erscheinen.

3.5. PROMOTORANALYSE

Die mit Hilfe der Datenbanksuche ermittelten genomischen Klone von *M. truncatula* enthielten neben den Genen *mfor_1* und *mfor_2* auch flankierende Sequenzen derselben, sodass durch Generierung spezifischer Primer jeweils eine ca. 1 kb große Promotorregion amplifiziert und kloniert werden konnte. Mittels des *GenomeWalker*TM-Systems konnte auch für *mfor_3* ein ca. 1 kb großes DNA-Fragment stromaufwärts des Start-Codon amplifiziert, kloniert und sequenziert werden. Für die in der Folge beschriebenen Aktivitäts-Tests erfolgte die Klonierung der drei Promotorregionen *prom/mfor_1*, *prom/mfor_2* und *prom/mfor_3* in die Vektoren:

- a) pUC103-GUS für die transiente Expression der Promotor-GUS-Fusionen in Protoplasten
- b) pBIN19 für die stabile Expression der Promotor-GUS-Fusionen in transgenen Tabakpflanzen

Als Kontrolle für die transienten Expressionsstudien in Protoplasten diente der phloemspezifische *Coconut Foliar Decay Virus* (CFDV)-Promotor (Hehn und Rohde, 1998).

3.5.1. Transiente Expression der Promotor-GUS-Konstrukte in Protoplasten

Nach erfolgreicher Transfektion isolierter Tabakprotoplasten konnte die transiente Expression der β -Glukuronidase, unter Kontrolle der drei Forisomen-Promotoren *prom/mfor_1*, *prom/mfor_2* und *prom/mfor_3*, durch den Umsatz des 4-MUG zu seinem fluoreszierenden Endprodukt 4-MU mittels fluorimetrischer Messung der Enzymaktivität bestimmt werden (2.2.9.1.). Im Vergleich zum phloemspezifischen *Coconut Foliar Decay Virus* (CFDV)-Promotor konnte somit die Aktivität der Forisomen-Promotoren ermittelt werden. Die Ergebnisse sind in Abb. 16 graphisch dargestellt.

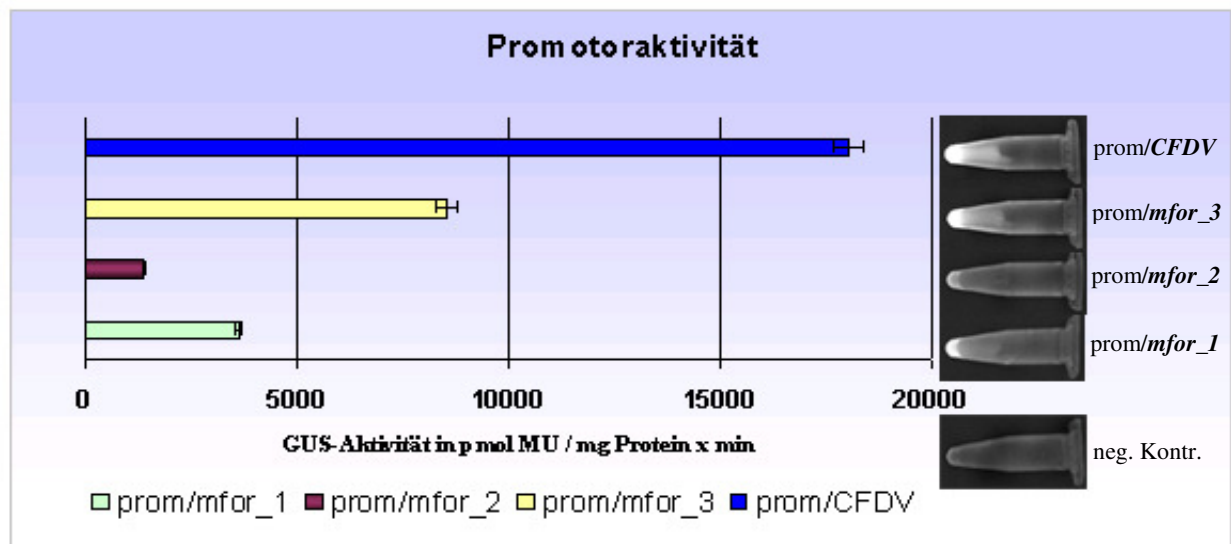


Abb. 16: Enzymaktivität der β -Glukuronidase unter Kontrolle der Forisomen-Promotoren im Vergleich zum phloemspezifischen CFDV-Promotor

Folgende Werte wurden gemessen:

prom/mfor_1: 3631 pmol MU / mg Protein x min (grüner Balken);

prom/mfor_2: 1379 pmol MU / mg Protein x min (roter Balken);

prom/mfor_3: 8561 pmol MU / mg Protein x min (gelber Balken);

prom/CFDV: 18036 pmol MU / mg Protein x min (blauer Balken).

Ein Vergleich der in Abb. 16 zusammengefassten GUS-Aktivitäten zeigt eine deutliche Abstufung in der Stärke der drei Promotoren der Forisomen-Gene in Protoplasten. Legt man die Aktivität des viralen CFDV-Promotors mit 100% zu Grunde, ergibt sich für prom/mfor_1 ein Wert von ca. 20 %, für prom/mfor_2 ein Wert von ca. 8% und für prom/mfor_3 ein Wert von ca. 47%. Der Promotor prom/mfor_3 weist folglich mit 47% – im Vergleich zum relativ starken CFDV-Promotor – die höchste Aktivität der Forisomen-Promotoren in Protoplasten auf.

3.5.2. Herstellung transgener Pflanzen

Durch Integration der Promotor-GUS-Konstrukte ins pflanzliche Genom und der darauf folgenden Regeneration transgener Pflanzen sollte der Ort der Promotoraktivität und damit verbunden der Bildungsort der Forisome bestimmt werden. Die Forisome der Fabaceen wurden bisher hauptsächlich in den Siebelementen, selten auch in den Geleitzellen des Phloems beobachtet, was vermuten ließ, dass die Aktivität der Promotoren der Forisomen-Gene *mfor_1*, *mfor_2* und *mfor_3* phloemspezifisch ist. Eine gewebeunabhängige Expression der β -Glukuronidase, wie beispielsweise unter Kontrolle des konstitutiven *Cauliflower*

Mosaic Virus (CaMV) 35S-Promotors, wurde daher nicht erwartet. Die Transformation von *M. truncatula* konnte zu diesem Zeitpunkt nicht durchgeführt werden, da eine *M. truncatula* - Sterilkultur sowie ein etabliertes Protokoll zur Erzeugung transgener Pflanzen nicht zur Verfügung stand. Aus diesem Grund wurde für alle nachfolgend beschriebenen Transformationen *Nicotiana tabacum* verwendet.

Mittels Wundinfektion von Blattstücken, durch ko-Kultivierung derselben mit *Agrobacterium tumefaciens*, konnte die stabile Integration der Promotor-GUS-Konstrukte ins pflanzliche Genom erreicht werden. Selektion durch Kanamycin-Resistenz und die Zugabe von Hormonen ermöglichte die Bildung von Gewebe-Kalli, später die Regeneration von Sprossen und Wurzeln und letztendlich transgener Tabakpflanzen (2.2.9.2.). Für das Konstrukt *prom/mfor_1* konnten auf diesem Weg sechs, für Konstrukt *prom/mfor_2* zehn und für das Konstrukt *prom/mfor_3* neun unabhängige Tabakpflanzen regeneriert werden. Die Aktivität der β -Glukuronidase, exprimiert unter Kontrolle der Forisomen-Promotoren, wurde durch Inkubation ganzer Blätter, Blattteile und Stängel-Querschnitte mit dem chromogenen Substrat X-Gluc – resultierend in einer Blaufärbung der Zellen lediglich an Orten der GUS-Expression – nachgewiesen (2.2.9.2.).

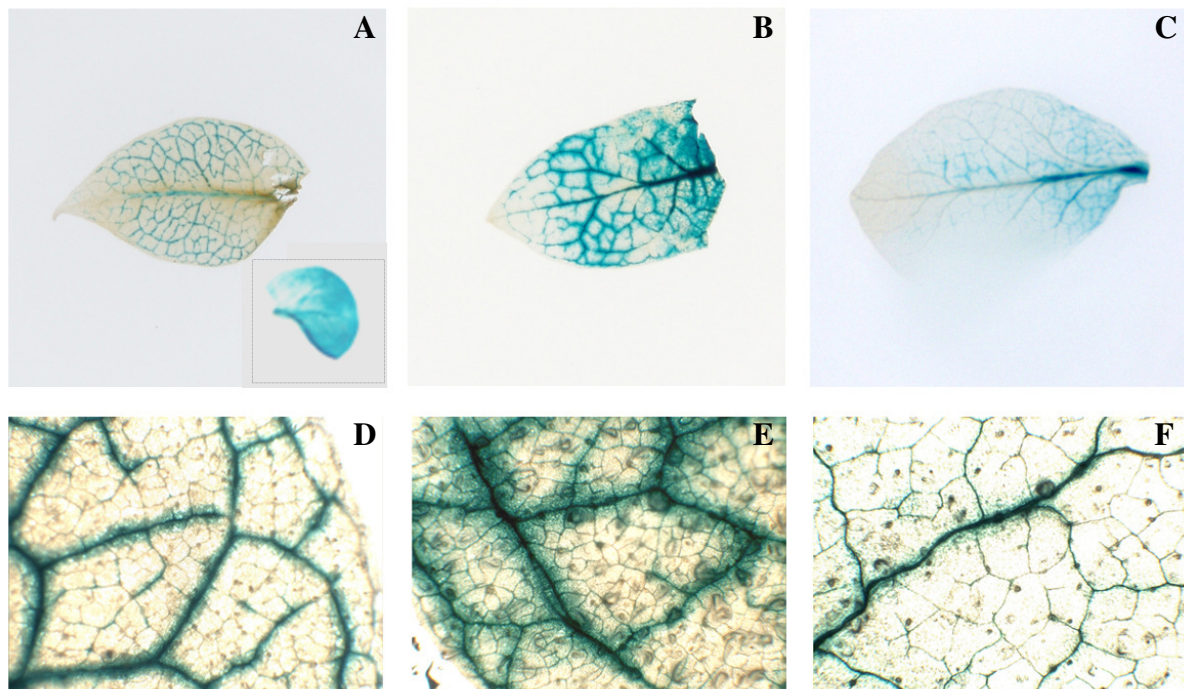


Abb. 17: Expression der β -Glukuronidase unter Kontrolle der Forisomen-Promotoren

(A) gefärbtes Blatt von Konstrukt *prom/mfor_1*; (D) dazugehörige Ausschnittsvergrößerung
Zum Vergleich in (A) eingefügt: konstitutive Expression der β -Glukuronidase unter Kontrolle des 35S-Promotors

(B) gefärbtes Blatt von Konstrukt *prom/mfor_2*; (E) dazugehörige Ausschnittsvergrößerung
(C) gefärbtes Blatt von Konstrukt *prom/mfor_3*; (F) dazugehörige Ausschnittsvergrößerung

Transgene Tabakpflanzen, in deren Genom die Promotor-GUS-Konstrukte stabil integriert wurden, zeigten nach Färbung der Blätter eine Expression der β -Glukuronidase ausschließlich in den Blattadern (Abb. 17). Allerdings wiesen nicht alle Adern der untersuchten Blattstücke eine durchgängige Blaufärbung auf, so etwa im Bereich der Blattspitze (Abb. 17 A-C).

Die Expression der β -Glukuronidase unter Kontrolle des Promotors *prom/mfor_2* resultiert im Vergleich zur Expression unter Kontrolle der Promotoren *prom/mfor_1* und *prom/mfor_3* in einer deutlich intensiveren Blaufärbung. Besonders auffällig war die schnelle Färbung der Blattadern an Stellen der Verwundung, erzeugt etwa durch das Abschneiden der Blätter (Abb. 17 B) oder die Quetschung mittels einer Pinzette. Während eine erste Enzymaktivität – visualisiert durch die Blaufärbung – unter Kontrolle des Promotors *prom/mfor_1* bzw. *prom/mfor_3* erst nach ca. 12 h auftrat, konnte sie unter Kontrolle des Promotors *prom/mfor_2* bereits nach ca. 4 h, allerdings nur an Orten der Verwundung beobachtet werden. Nach ca. 12 h erstreckte sich auch die Blaufärbung der Blätter dieses Konstruktes über das gesamte Adersystem. Die intensive und vor allem schnelle Färbung der Stellen nach Verwundung der Blätter konnte allerdings für die Konstrukte *prom/mfor_1* und *prom/mfor_3* nicht gezeigt werden.

Die Analyse der Quer- und Längsschnitte der Blattstiele dieser Pflanzen zeigt eine deutliche Blaufärbung des Phloems, während das umgebende Gewebe und die Bereiche des Xylems keine Aktivität der β -Glukuronidase und somit keine Färbung aufweisen (Abb. 18). Aufgrund des geringen Wachstums der Pflanzen und der Diffusion des Farbstoffes in die benachbarten Zellen konnte keine Aussage darüber getroffen werden, ob die Expression der β -Glukuronidase in den Siebelementen oder aber in den Geleitzellen erfolgt. Zu diesem Zweck soll künftig eine Fixierung des Pflanzenmaterials und eine anschließende Analyse der Quer- bzw. Längsschnitte durchgeführt werden.

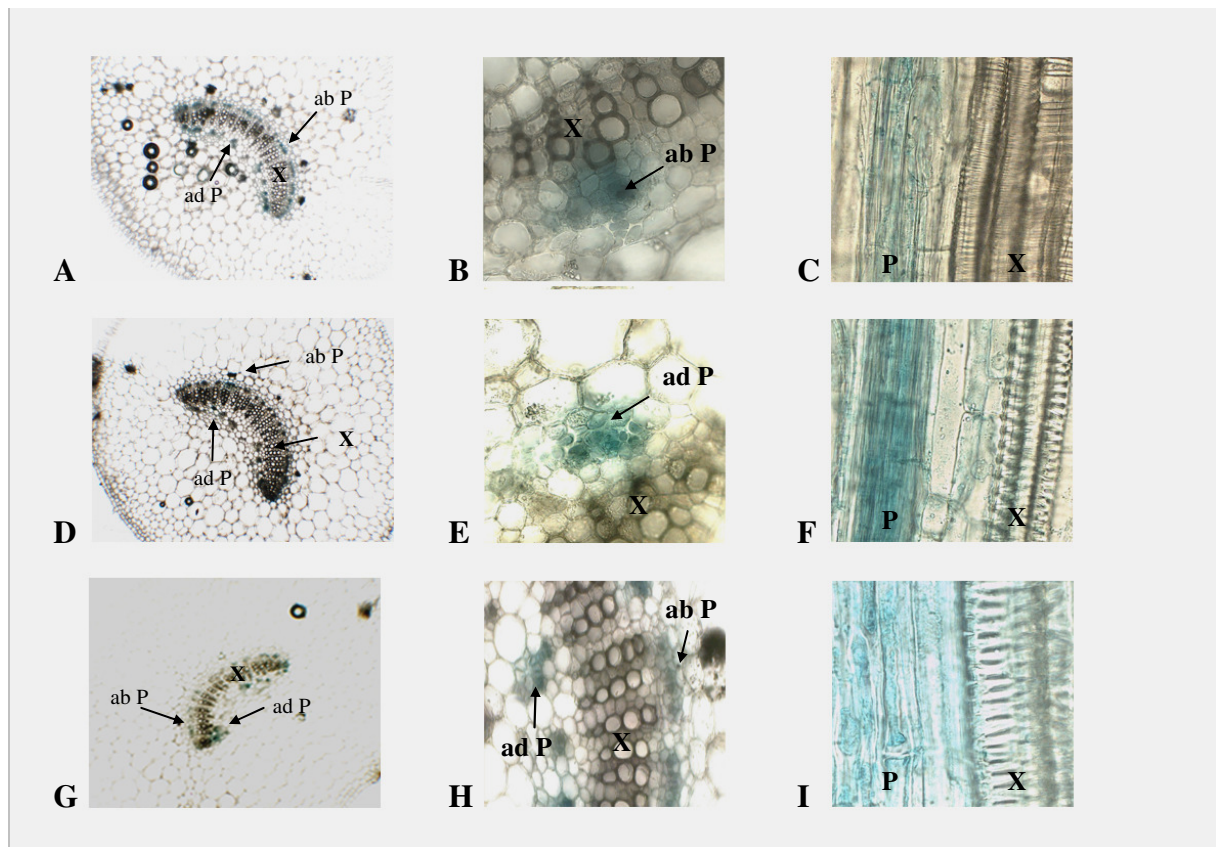


Abb. 18: Phloem-Spezifität der drei Forisomenpromotoren

(A) Querschnitt des Blattstiels eines *prom/mfor_1* Konstruktes; (B) dazugehörige Ausschnittsvergrößerung; (C) Längsschnitt der Sprossachse eines *prom/mfor_1* Konstruktes
 (D) Querschnitt des Blattstiels eines *prom/mfor_2* Konstruktes; (E) dazugehörige Ausschnittsvergrößerung; (F) Längsschnitt der Sprossachse eines *prom/mfor_2* Konstruktes
 (G) Querschnitt des Blattstiels eines *prom/mfor_3* Konstruktes; (H) dazugehörige Ausschnittsvergrößerung; (I) Längsschnitt des Blattstiels eines *prom/mfor_3* Konstruktes

X = Xylem; P = Phloem; ad P = adaxiales Phloem; ab P = abaxiales Phloem

Auf Basis der vorliegenden Ergebnisse kann sicher davon ausgegangen werden, dass die Promotoren *prom/mfor_1*, *prom/mfor_2* und *prom/mfor_3* phloemspezifisch sind, da sich die Aktivität der β -Glukuronidase ausschließlich auf Bereiche des Phloems beschränkt.

Die Grundlage der molekularen Untersuchungen an Forisomen bildete die Möglichkeit, diese Proteinkomplexe in ausreichenden Mengen sowohl aus *Vicia faba* als auch aus *Canavalia gladiata* mittels Dichtegradientenzentrifugation aufzureinigen. Die dadurch ermöglichte Generierung von Peptidsequenzen der Forisomen-Untereinheiten, aber auch die vor Kurzem begonnene Entschlüsselung des Genoms von *Medicago truncatula* lieferten nützliche Daten, die sich vor allem für die Klonierung der Forisomen-Gene als hilfreich erwiesen. Allerdings war es für *M. truncatula* nicht möglich, mittels der beschriebenen Methode (2.2.1.) Forisome in ausreichenden Mengen aufzureinigen, da sich schon die Präparation des Phloems aufgrund der sehr dünnen Sprossachsen als äußerst schwierig erwies und diese Pflanze zudem verhältnismäßig kleine Forisome aufweist. Aufgrund dessen musste – je nach Experiment – mit Forisomen, Peptidsequenzen und letztendlich DNA-Sequenzen aller drei Pflanzen gearbeitet werden, was die Interpretation einiger Daten erschwerte.

4.1.**DIE UNTEREINHEITEN DER FORISOME****Die Auftrennung der einzelnen Untereinheiten**

Forisome haften aufgrund ihrer bisher noch unbekannten Oberflächenbeschaffenheit sehr gut an Materialien wie Glas und Plastik. Mittels Zentrifugation und der dadurch bedingten Haftung der Forisome an der Reaktionsgefäßwand konnten problemlos zusätzliche Waschschritte durchgeführt und somit Kontaminationen durch ko-aufgereinigte Proteine entscheidend minimiert werden. Die Denaturierung der Forisome nach ihrer Aufreinigung über den Dichtegradienten und die Auftrennung mittels SDS-PAGE gewährleisteten erste Einblicke in den molekularen Aufbau der Proteinkomplexe. SDS-PAA-Gele aufgetrennter *V. faba*-Forisome zeigten Proteinbanden bei ca. 70 kDa, 130 kDa und im Bereich von 200 kDa-350 kDa (Abb. 4C). Genauere Untersuchungen galten den Untereinheiten bei ca. 70 kDa, da das Bandenmuster der Proteine mit größeren Molekülmassen darauf schließen ließ, dass es sich um Dimerisierungs- bzw. Multimerisierungsderivate der kleineren Untereinheiten handelt.

Die Optimierungen der SDS-PAGEs von *V. faba*-Forisomen resultierten im Bereich von ca. 70 kDa in zwei Proteinbanden, wobei die größere Untereinheit mengenmäßig wesentlich stärker vertreten war. Im Gegensatz dazu konnte unter Verwendung von *C. gladiata*-Forisomen lediglich eine Untereinheit bei ca. 70 kDa beobachtet werden (Abb. 10A). Die

Annahme, dass es sich bei den Forisomen der verschiedenen Fabaceen um Proteinkomplexe ähnlicher Struktur handelt, wurde durch diese Beobachtung vorerst nicht bestätigt.

Die Kalzium-Reaktion der Untereinheit FOR_2

Erst die Zugabe von CaCl_2 in das 7%ige SDS-PAA-Gel, aufgrund der Fähigkeit der Forisome auf Ca^{2+} mit einer Konformationsänderung zu reagieren, ermöglichte die Auftrennung der Proteinkomplexe in drei distinkte Proteinbanden im Bereich von 65 kDa bis 70 kDa, sowohl für *V. faba*- (Abb. 8B und 9B) als auch für *C. gladiata*-Forisome (Abb. 10B). Grundlage hierfür war die Veränderung des Laufverhaltens einer Forisomen-Untereinheit – bezeichnet als FOR_2 – in Ca^{2+} -haltigen SDS-PAA-Gelen, vermutlich basierend auf einer Ca^{2+} -induzierten Konformationsänderung dieses Proteins. Aufgrund der daraus resultierenden, scheinbaren Veränderung der Molekülmasse von FOR_2 bandiert diese UE in Ca^{2+} -haltigen SDS-PAA-Gelen nicht mehr auf Höhe der Forisomen-UE FOR_1 und ermöglichte somit die Auftrennung des Proteinkomplexes im Bereich von 70 kDa in seine Untereinheiten FOR_1, FOR_2 und FOR_3. Zugleich konnte mittels der Ca^{2+} -haltigen SDS-PAA-Gele eine Auftrennung der Proteinbande bei ca. 130 kDa in ebenfalls drei distinkte Banden erreicht werden (Abb. 10 B, C). Dies bestätigt die Vermutung, dass es sich dabei tatsächlich um Dimerisierungsderivate der kleineren Untereinheiten handelt. Die Einheitlichkeit des Proteinbandenmusters der Ca^{2+} -haltigen SDS-PAA-Gele beider Arten führte zur ebenfalls einheitlichen Bezeichnung der Forisomen-Untereinheiten, allerdings mit dem Zusatz der Kürzel „C“ für *C. gladiata* und „V“ für *V. faba*.

Weiterführende Möglichkeiten der Analyse des Proteinkomplexes hinsichtlich seiner Untereinheiten

Der Vergleich von Ca^{2+} -freien und Ca^{2+} -haltigen SDS-PAA-Gelen zeigte, dass mehrere der Forisomen-Proteine aufgrund ähnlicher Molekulargewichte auf einer Höhe bandieren. Obwohl die Zugabe von Ca^{2+} in einer Auftrennung der drei Untereinheiten resultiert, ist nicht auszuschließen, dass die Banden aus weiteren Proteinen mit gleichem Laufverhalten bestehen. Die Auftrennung von *V. faba*-Forisomen mittels isoelektrischer Fokussierung (IF) resultiert im Bereich von ca. 70 kDa in wesentlich mehr Proteinen, als aufgrund der eindimensionalen Gele zu erwarten war (Daten nicht gezeigt). Allerdings könnten posttranslationale Modifikationen wie Phosphorylierung und Glykosylierung eine entscheidende Rolle bei der Menge der Spots spielen. Antikörper sowohl gegen solche Modifikationen (z.B. phosphorylierte Aminosäuren) als auch gegen die einzelnen rekombinanten Untereinheiten

könnten weitere Erkenntnisse über den Aufbau der Forisomen liefern. Wesentlich effektiver wäre die Verwendung von Forisomen aus *C. gladiata* für die IF, da schon aus der eindimensionalen SDS-PAGE ersichtlich wird, dass die Protein-Menge der einzelnen Untereinheiten im Vergleich zu *V. faba*-Forisomen wesentlich höher ist. Möglicherweise hängt dies mit der deutlich geringeren Stabilität der Multimerisierungsderivate der *C. gladiata*-Forisome zusammen, erkennbar anhand einer vergleichsweise schwachen Dimerisierungsbande in Abb. 10 A, so dass wahrscheinlich mehr Protein in Form der Monomere vorliegt.

4.2. DIE KLONIERUNG DER FORISOMEN-GENE *mfor 1*, *mfor 2* UND *mfor 3*

Die Generierung von Peptidsequenzen

Je nach experimentellem Stadium der Auftrennungsmöglichkeiten der Forisome in ihre Untereinheiten wurden immer wieder Proteinbanden aus den SDS-PAA-Gelen isoliert und für die Peptidsequenzierung an die verschiedenen Firmen gesandt (2.2.5.). In ersten Versuchen bandierten alle drei Untereinheiten von *V. faba* im Bereich von ca. 70 kDa auf einer Höhe im SDS-PAA-Gel und wurden somit zusammen isoliert und sequenziert. Die Reduzierung der Acrylamidkonzentration von 10% auf 7% ermöglichte die Auftrennung von zwei verschiedenen Banden bei ca. 70 kDa (Abb. 4 C). Allerdings konnte erst nach Zugabe von Ca^{2+} die Separierung der drei Proteine und damit auch die Sequenzierung einzelner Untereinheiten anstelle von Proteingemischen erreicht werden. Es sollte jedoch erwähnt werden, dass bis zum heutigen Zeitpunkt nicht ausgeschlossen werden kann, dass eine oder mehrere der drei Banden bei ca. 70 kDa im SDS-PAA-Gel trotzdem von mehreren Proteinen mit gleicher Laufeigenschaft oder aber gleichem Molekulargewicht gebildet werden. Hinweise dafür liefern einige generierte Peptidsequenzen der 70 kDa großen Untereinheit von *V. faba*, die in der Aminosäuresequenz der drei Forisomen-Untereinheiten MFOR_1, MFOR_2 und MFOR_3 nicht enthalten sind (Abb. 6). Eine mögliche Erklärung dafür wäre allerdings auch der Sequenzunterschied zwischen den Forisomen-Genen von *V. faba* bzw. *C. gladiata* (als „Peptidlieferanten“) und *M. truncatula* (auf deren Basis die Gene kloniert wurden).

Die Verwendung abgeleiteter Oligonukleotide für die PCR

Die Ableitung degenerierter Oligonukleotide erfolgte jeweils im Anschluss an den Erhalt der Peptidsequenzen, so dass vor allem das oben beschriebene Problem der Überlagerung von Proteinbanden im SDS-PAA-Gel zu erheblichen Schwierigkeiten bei der Klonierung der Forisomen-Gene führte.

Mögliche Erklärungen dafür könnten sein:

- Die Überlagerung der Protein-Untereinheiten in der Ca^{2+} -freien SDS-PAGE und, daraus resultierend, Peptidsequenzen verschiedener Untereinheiten ohne die Möglichkeit, sie einander zuzuordnen zu können.
- Die unterschiedliche Anzahl von Aminosäuren der generierten Peptidsequenzen und dadurch bedingte, stark abweichende Anlagerungstemperaturen der designten degenerierten Oligonukleotide.
- Die Unkenntnis der Lage der Peptide zueinander innerhalb der Polypeptidkette einer UE.
- Die Kürze und Degeneration der abgeleiteten Oligonukleotide, aufgrund derer die hohe Anlagerungstemperatur als Voraussetzung für das *genome walking* (68°C, bedingt durch die Länge des von der Firma zur Verfügung gestellten Adapter-Oligonukleotids) nicht gewährleistet werden konnte
- Die fehlenden Informationen über Bildungsort, Menge und Stabilität der Forisomen-spezifischen mRNAs als möglicher Unsicherheitsfaktor für die RT-PCR

Resultat zahlreicher Amplifikationen mittels PCR und anschließender Klonierung sowie automatischer Sequenzanalyse waren ebenso zahlreiche Sequenzabschnitte, innerhalb derer allerdings keine Peptidsequenzen der Forisomen-Untereinheiten gefunden werden konnten. Daher war eine Zuordnung der ermittelten DNA-Sequenzen zu den Forisomen-Genen nicht möglich.

Die Datenbanksuche

Die Erstellung einer öffentlich zugänglichen EST-Datenbank von *M. truncatula* erlaubte einen Sequenzvergleich unter Verwendung der generierten Peptide der Forisomen-Untereinheiten. In Folge dessen konnte eine 157 Aminosäuren umfassende Polypeptidkette und deren zugehörige DNA-Sequenz ermittelt werden, die zwei der aufgeführten Peptidsequenzen (3.1.3. Tab. 1B) enthielt. Auf dieser Grundlage erfolgte die Klonierung des Forisomen-Gens *mfor_1* aus *M. truncatula* durch den Einsatz spezifischer Oligonukleotide

und die Verwendung des *GenomeWalker*TM-Systems (2.2.4.). Des Weiteren gelang unter gleichen Voraussetzungen die Klonierung der Gene *vfor_1* aus *V. faba* (M. Fontanellaz, persönliche Mitteilung) und *cfor_1* aus *C. gladiata* (A. Ashoub, persönliche Mitteilung). Die offenen Leseraster der Gene umfassen 1889 bp (*mfor_1*), 2068 bp (*vfor_1*) und 2042 bp (*cfor_1*) und zeigten mehrere der ermittelten Peptidsequenzen der Forisomen-Proteine. Ein Sequenzvergleich der drei *for_1*-Gene resultierte in einer 62%igen Homologie, was das Fehlen einiger Peptidsequenzen der *V. faba*- bzw. *C. gladiata*- Forisome im *mfor_1*-Gen erklären könnte. Weitere Sequenzvergleiche, sowohl mit Hilfe der EST-Datenbank von *M. truncatula* als auch der NCBI-Datenbank unter Verwendung des *mfor_1*-Gens, ermöglichten die Klonierung der Forisomen-Gene *for_2* und *for_3* aus *M. truncatula*. Da sich eine Amplifikation der Gene *for_2* und *for_3* mit Hilfe spezifischer Oligonukleotide der *M. truncatula*-Gene für die beiden anderen Fabaceen als schwierig erwies, wurde die Klonierung dieser Gene vorerst nicht weiter verfolgt und daraufhin alle weiteren Studien ausschließlich an den Forisomen-Genen aus *M. truncatula* durchgeführt.

4.3. DIE ANALYSE DER FORISOMEN-GENE *mfor_1*, *mfor_2* UND *mfor_3*

Die offenen Leseraster der drei Forisomen-Gene kodieren für Proteine mit den Molekulargewichten 72 kDa (*mfor_1*), 77 kDa (*mfor_2*) und 80 kDa (*mfor_3*), wobei diese Angaben nicht exakt mit dem Laufverhalten der einzelnen Untereinheiten aufgereinigter Forisome in der SDS-PAGE korrelieren. Ähnliche Beobachtungen wurden bereits für andere Proteine, beispielsweise für das Transportprotein des phytopathogenen *potato leafroll virus* (PLRV; Tacke *et al.*, 1993) beschrieben. Nach Vorlage der Gene wurden Sequenzanalysen hinsichtlich verwandter Gene anderer Organismen und möglicher bekannter Ca²⁺-Bindungsdomänen durchgeführt.

Die Suche nach Sequenzhomologien und bekannten Ca²⁺-Bindungsmotiven

Weder der Abgleich der drei Forisomen-Gene mit den vollständig sequenzierten Genomen von *Arabidopsis thaliana* und *Oryza sativa* noch die Verwendung gängiger Protein-Datenbanken für einen Sequenzvergleich resultierten in der Identifizierung signifikant homologer Gene bzw. Proteine.

Die stärkste Homologie mit ca. 25% Identität zu *mfor_1* zeigte die Aminosäuresequenz eines Proteins (At3g01680; www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) aus *A. thaliana*, dessen Funktion jedoch unbekannt ist. Während die gesamte Sequenz nur sehr geringe Übereinstimmung mit

den Forisomen-Genen aufwies, konnte eine carboxyterminale Abfolge mehrerer Cysteine dieses Klons für alle drei Forisomen-Gene übereinstimmend identifiziert werden (in Abb. 6 rot hinterlegt).

Die Konformationsänderung der Forisome vom kondensierten in den dispergierten Zustand nach Zugabe von Ca^{2+} führt nicht zur vollständigen Auflösung der Proteinkomplexe – sie bleiben als distinkte Körper erhalten – und ist vollständig reversibel (Knoblauch *et al.*, 2003). Eine Funktion der Cysteine bei der Stabilisierung des Proteinkomplexes durch die Ausbildung von Disulfidbrücken der Seitenketten wäre denkbar. Möglicherweise dienen diese kovalenten Bindungen der Verknüpfung der einzelnen Untereinheiten und ermöglichen nach Entzug von Ca^{2+} die geordnete Rückfaltung der Forisome in die kondensierte Konformation.

Die Vermutung, dass eines oder mehrere der Forisomen-Proteine aufgrund der Kalzium-Reaktion des Proteinkomplexes in eine der Familien der EF-Hand-Proteine einzuordnen sei, konnte nicht bestätigt werden. Keines der bisher bekannten Ca^{2+} -Bindungsmotive konnte auf einem der Forisomen-Proteine gefunden werden.

Das *coiled coil* Motiv der Forisomen-Untereinheit MFOR_2

Nach Analyse der drei Forisomen-Untereinheiten hinsichtlich bekannter Sequenz-Motive wurde für die Aminosäuresequenz des MFOR_2 eine 35 AS umfassende *coiled coil* Domäne identifiziert (Abb. 7A). Wesentliches Merkmal dieses Motivs ist die Ausbildung einer amphipatischen α -Helix (Abb. 7B). Die *coiled coil* Domäne ist verantwortlich für die Oligomerisierung von Protein-Untereinheiten und damit auch für die Faltung der Proteine. Sie wurde erstmals für das Intermediärfilament-Protein Keratin (McArthur, 1943; Burkhard *et al.*, 2001), später beispielsweise auch als Dimerisierungs-Domäne einer Familie von Transkriptionsfaktoren, den Leuzin-Zipfern (Landschulz *et al.*, 1988), beschrieben. Zwei bis fünf solcher amphipatischen α -Helices bilden eine Superhelix aus, die so genannten *coiled coils*. Dabei besteht sowohl die Möglichkeit einer parallelen bzw. antiparallelen Assoziation der α -Helices als auch die Ausbildung von Homo- und Heterodimeren bzw. -multimeren (Lupas, 1992). Es konnte gezeigt werden, dass spezifische Mutationen in der amphipatischen α -Helix des Transportproteins von PLRV mit dem Verlust der Fähigkeit zur Ausbildung von Multimerisierungsderivaten einhergingen (Tacke *et al.*, 1993).

An Position a und d der für die *coiled coil* Domäne typischen Wiederholung einer 7AS umfassenden Abfolge (a,b,c,d,e,f,g) sitzen bevorzugt unpolare, hydrophobe AS, deren Interaktion die Ausbildung des hydrophoben Kerns, der *coiled coils* induziert (Crick, 1953; Lupas, 1996). Geladene Aminosäuren, häufig an Positionen außerhalb des hydrophoben

Kerns können nach Veränderungen des pH-Wertes im umgebenden Medium (Suzuki *et al.*, 1997; Krylov *et al.*, 1998), nach Phosphorylierung der AS-Seitenketten (Szilak *et al.*, 1997) und nach Interaktion mit Ionen (Farah und Reinach, 1999) die hydrophobe Interaktion der *coiled coil* Domänen entscheidend beeinflussen. Die *coiled coil* Domäne der Forisomen-Untereinheit MFOR_2 ist mit 35 AS relativ kurz, was allerdings für einige globuläre Proteine mit weniger als 20 AS bereits beschrieben wurde (Lupas, 1996). Eine mögliche Funktion der *coiled coil* Domäne des MFOR_2 für die Ca^{2+} -Reaktion der Forisome wird in Abschnitt 4.6 erörtert.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass es sich bei den Forisomen-spezifischen Genen um eine neue Genfamilie handelt, die keinerlei signifikante Homologie zu bereits bekannten Genen aufweist. Des Weiteren konnte bis zu diesem Zeitpunkt kein bekanntes Bindungsmotiv gefunden werden, dass für die Ca^{2+} -Bindung der Proteinkomplexe verantwortlich ist, obwohl für eine Untereinheit, möglicherweise MFOR_2, eine Ca^{2+} -Reaktion nachgewiesen werden konnte. Eventuell ist das *coiled coil* Motiv an der Ca^{2+} -Reaktion der Forisome beteiligt.

Mögliche weitere Forisomen-Gene

Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen der Forisomen-Untereinheiten MFOR_1, MFOR_2 und MFOR_3 zeigte in einigen kurzen Bereichen eine fast 100%ige Homologie (in Abb. 6 gelb hinterlegt). Erneuter Sequenzabgleich dieser signifikant homologen Bereiche (ca. 10 AS lang) mit der Medicago-Datenbank resultierte in zwei weiteren Aminosäuresequenzen mit ca. 50%iger Übereinstimmung. Allerdings konnte auch für diese Polypeptidketten keinerlei Homologie zu bereits bekannten Proteinen gefunden werden. Ebenso war die Suche nach EF-Hand-Motiven und anderen Ca^{2+} -Bindungsdomänen erfolglos. Es handelt sich aber bis zu diesem Zeitpunkt lediglich um Fragmente der möglichen Forisomen-Untereinheiten, so dass eine endgültige Aussage bezüglich bekannter Motive an dieser Stelle noch nicht eindeutig getroffen werden kann. Eine vollständige Analyse der potentiell weiteren Forisomen-Gene war jedoch im zeitlichen Rahmen der hier zusammengefassten Untersuchungen nicht mehr möglich. Die zukünftige Klonierung und anschließende Charakterisierung dieser Proteine wird Aufschluss über ihre Beteiligung am Aufbau der Forisome geben.

Es ist ebenfalls noch unklar, ob es Proteine gibt, die am Aufbau der Forisomen beteiligt sind, jedoch geringe bzw. keine Sequenzhomologien zu den bereits bekannten Forisomen-Untereinheiten aufweisen. Eine wahrscheinliche Interaktion solcher Proteine mit den

Untereinheiten MFOR_1, MFOR_2 oder MFOR_3 könnte zu ihrer Identifizierung unter Verwendung eines Hefe-2-Hybrid-Systems führen.

4.4. Rekombinante Herstellung der Forisomen-Untereinheiten und immunologischer Nachweis ihrer Beteiligung am Aufbau der Forisome

Nach Klonierung und Analyse der Forisomen-Gene *mfor_1*, *mfor_2* und *mfor_3* gelang deren Expression im bakteriellen System als Fusionsproteine mit der Glutathion-S-Transferase.

In Folge dessen konnten die Proteine GST-MFOR_1 und GST_MFOR_2 aus dem SDS-PAA-Gel in großen Mengen isoliert und für die Immunisierung von Kaninchen zur Herstellung polyklonaler Antikörper verwendet werden. Die Expression von GST-MFOR_3 wurde zwar mittels eines monoklonalen anti-GST-Antikörpers eindeutig nachgewiesen, allerdings genügte die Protein-Ausbeute nicht für die Antikörperproduktion.

Analog zur Bezeichnung der über SDS-PAGE aufgetrennten Untereinheiten der Forisome mit MFOR_1, MFOR_2 und MFOR_3 erfolgte die Benennung der Gene mit *mfor_1*, *mfor_2* und *mfor_3*, jedoch lediglich aufgrund der Zuordnung einiger Peptidsequenzen der ca. 70 kDa großen Untereinheiten aufgereinigter Forisome zur Aminosäuresequenz der Gene. Daher muss darauf hingewiesen werden, dass ein Großteil der Peptide aus homologen Sequenz-Bereichen der Forisomen-Gene stammt. Ein Vergleich der *for_1*-Gene von *V. faba* und *M. truncatula* zeigt des Weiteren eine lediglich 62%ige Homologie zwischen den Peptiden der *V. faba*-Forisome und der Aminosäuresequenz der *M. truncatula*-Proteine. Unter Berücksichtigung dieser Fakten ist die Zuordnung der Forisomen-Gene zu den Untereinheiten aufgereinigter Proteinkörper auf Basis der generierten Peptide nicht eindeutig möglich. Daher sollte die Analyse mittels der polyklonalen Antikörper anti-MFOR_1 und anti_MFOR_2 die Zuordnung der rekombinant hergestellten Forisomen-Untereinheiten MFOR_1 und MFOR_2 und damit der Gene *mfor_1* und *mfor_2* zu den Untereinheiten der über SDS-PAGE aufgetrennten Forisome ermöglichen.

Da aufgrund der ungenügenden Expression von MFOR_3 die Herstellung eines anti-MFOR_3-Antikörpers nicht möglich war, konnte auf diesem Wege eine Zuordnung dieser Untereinheit zu den Banden aufgetrennter Forisomen nicht erfolgen. Aus diesem Grund wurden außerdem *V. faba* und *C. gladiata*-Forisome mittels Dichtegradientenzentrifugation aufgereinigt, über SDS-PAGE aufgetrennt und die ca. 70 kDa großen Untereinheiten für die Immunisierung von Mäusen verwendet. Die Detektion des GST-MFOR_3 mittels der anti-vf bzw. anti-can-Antikörper ermöglichte zumindest die Aussage, ob diese Untereinheit am

Aufbau der Forisome beteiligt ist. Eine Gegenüberstellung und schematische Zusammenfassung der Ergebnisse der Immunodetektion aufgetrennter *V. faba*-Forisome durch die verschiedenen Antikörper ist in der nachfolgenden Abbildung dargestellt. Für *C. gladiata*-Forisome war eine derart detaillierte Analyse nicht möglich, da eine Reaktion des prä-immun-Serums des anti-MFOR_2-Antikörpers mit aufgereinigten *C. gladiata*-Forisomen erfolgte (Abb. 13 B).

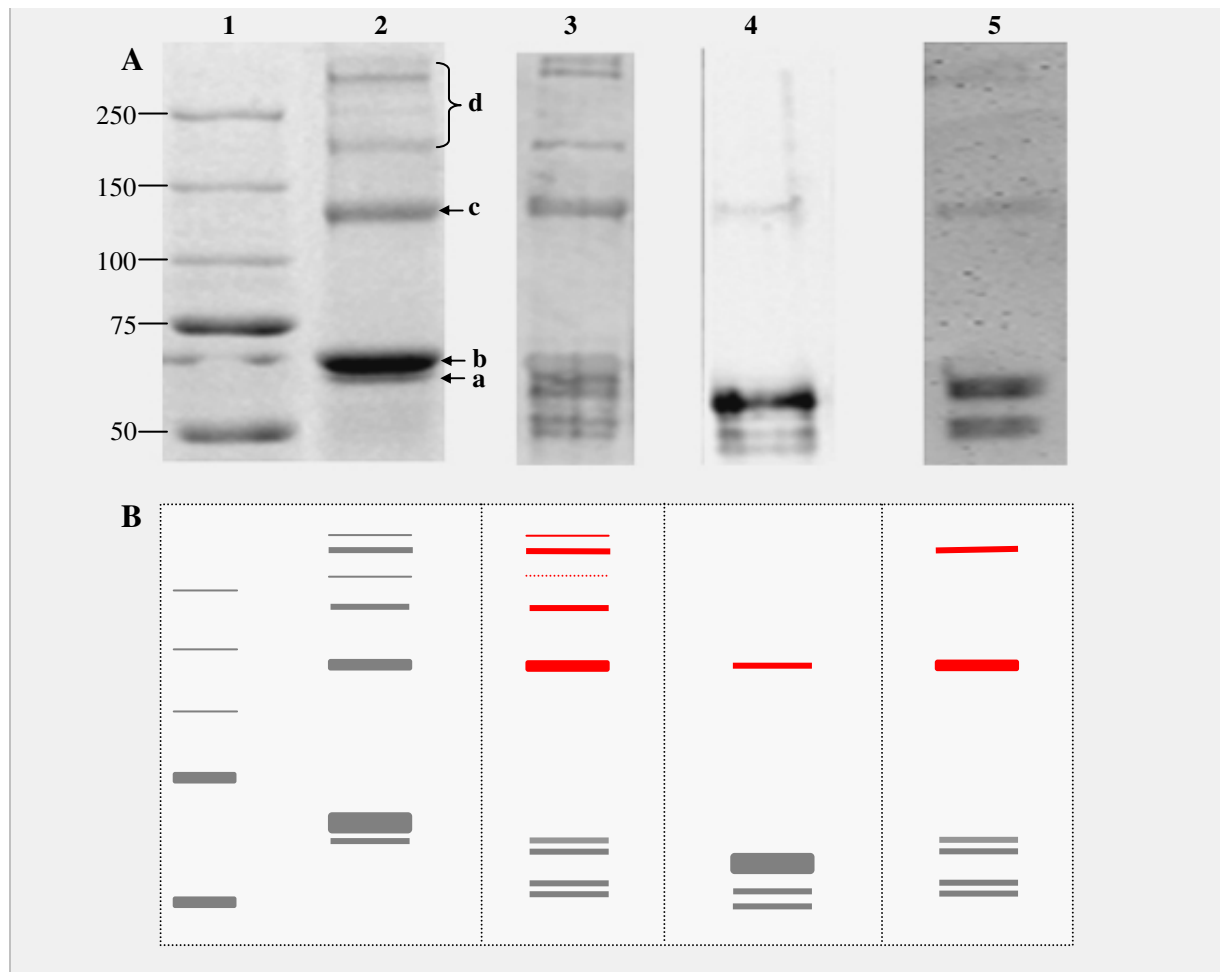


Abb. 19: Vergleich der Western-Blot-Analysen der verschiedenen Antikörper mit dem Bandenmuster aufgereinigter und aufgetrennter Forisome aus *V. faba*.

(A) **Spur 1:** Proteinmarker, **Spur 2:** SDS-PAA-Gel aufgereinigter Forisome aus *V. faba* nach Färbung mit Coomassie Brilliant Blue, **Spur 3:** Western-Blot-Analyse aufgereinigter Forisome aus *V. faba* unter Verwendung des polyklonalen anti-MFOR_1-Antikörpers,

Spur 4: Western-Blot-Analyse aufgereinigter Forisome aus *V. faba* unter Verwendung des polyklonalen anti-MFOR_2-Antikörpers, **Spur 5:** Western-Blot-Analyse aufgereinigter Forisome aus *V. faba* unter Verwendung des polyklonalen anti-vf-Antikörpers

(B) Schematische Darstellung von Abb. 19 A. Übereinstimmende Banden in Western-Blot-Analyse und SDS-PAA-Gel sind rot gekennzeichnet

Zuordnung der MFOR_1-Untereinheit zu den Proteinen aufgetrennter *V. faba*-Forisome

Aus Abbildung 19 wird deutlich, dass der polyklonale anti-MFOR_1-Antikörper vier Banden im Bereich von ca. 70 kDa detektiert. Allerdings konnte keine dieser Banden dem Bandenmuster der SDS-PAGE aufgereinigter Forisome aus *V. faba* eindeutig zugeordnet werden. Die mengenmäßig stärkste Bande (Abb. 19 A, Spur 2, b) wurde mittels dieses Antikörpers nur unspezifisch erkannt.

Bezüglich der diffusen Detektion dieser Hauptbande (Abb. 19 A, Spur 2, b) kann einerseits vermutet werden, dass es sich um eine Kreuzhybridisierung mit einer anderen Forisomen-Untereinheit handelt. Andererseits wurden mittels Sequenzierung der AS dieser Hauptbande mehrere Peptide generiert, die der *mfor_1*-kodierten Untereinheit zugeordnet werden konnten. Darüber hinaus zeigt die Immunodetektion nativer Forisome unter Verwendung des anti-MFOR_1-Antikörpers ein auffallend starkes Signal (Abb. 15 D), was vermuten lässt, dass dieses Protein in großen Mengen im Proteinkörper vertreten ist. Es ist daher nicht auszuschließen, dass die ca. 70 kDa große Hauptbande tatsächlich die Untereinheit MFOR_1 darstellt, die lediglich aufgrund posttranslationaler Modifikationen wie Phosphorylierungen und Glykosylierungen vom anti-MFOR_1-Antikörper aufgrund von Maskierungen der Epitope nicht erkannt werden kann. Die vier kleineren Banden im Bereich von ca. 70 kDa könnten auch Prozessierungen des größeren Proteins bei ca. 70 kDa darstellen, die im Forisom andere Aufgaben erfüllen. Allerdings besteht ebenfalls die Möglichkeit, dass es sich um stabile Abbauprodukte des Hauptproteins handelt, die die Modifizierungen nicht mehr aufweisen und daher dem anti-MFOR_1-Antikörper zugänglich sind. Die Reaktion des anti-MFOR_1-Antikörpers gegen aufgereinigte Forisome aus *C. gladiata* resultiert in einer Detektion der Hauptbande, wobei auch hier weitere kleinere Proteine erkannt werden (Abb. 12 B, Spur 4). Diese Beobachtungen und die nachfolgend beschriebene Reaktion des anti-vf-Antikörpers könnten darauf hinweisen, dass die Forisomen-Untereinheit MFOR_1 tatsächlich die ca. 70 kDa große Hauptbande aufgetrennter *V. faba*-Forisome bildet.

Hingegen ist die Reaktion des anti-MFOR_1-Antikörpers gegen die Dimerisierungs- und Multimerisierungsderivate der kleineren Untereinheiten eindeutig. Es muss davon ausgegangen werden, dass an jeder Di- bzw. Multimerisierung die Untereinheit MFOR_1 beteiligt ist. Dabei könnte es sich sowohl um Homo- als auch Heterodimere bzw. -multimere handeln.

Zuordnung der MFOR_2-Untereinheit zu den Proteinen aufgetrennter *V. faba*-Forisome

Im Gegensatz zum anti-MFOR_1-Antikörper erfolgte die Immunantwort des anti-MFOR_2-Antikörpers erst im Anschluss an die zweite Immunisierung des Kaninchens. Darüber hinaus war die Detektion der *V. faba*-Untereinheiten in der Western-Blot-Analyse im Verhältnis deutlich schwächer. Erklärbar wäre dies entweder mit einer geringeren Immunogenität von MFOR_2 oder aber mit dem mengenmäßig geringeren Anteil dieser Untereinheit in den Forisomen. Die Detektion des Immunsersums gegen eine Bande, die im Coomassie-Gel nicht beobachtet werden konnte, spricht möglicherweise für die geringe Menge der Forisomen-Untereinheit MFOR_2 im Proteinkörper. Betrachtet man zusätzlich die Immunodetektion nativer Forisome durch diesen Antikörper (Abb. 15 F), so lässt die lediglich punktuelle Fluoreszenz kondensierter Proteinkörper ebenfalls darauf schließen, dass MFOR_2 möglicherweise nicht in vergleichbar hoher Menge wie MFOR_1 vorkommt, sondern wesentlich schwächer vertreten ist. Allerdings besteht auch hier die Möglichkeit, dass der anti-MFOR_2-Antikörper lediglich ein prozessiertes Protein erkennt, während die eigentliche Forisomen-Untereinheit MFOR_2 ebenfalls auf Höhe des 70 kDa großen Hauptproteins bandiert.

Die Detektion der Dimerisierungsbande durch den anti-MFOR_2-Antikörper, analog zur Detektion dieser Bande mittels des anti-MFOR_1-Immunsersums, legt die Vermutung nahe, dass es sich dabei entweder um ein Heterodimer aus MFOR_1 und MFOR_2 oder aber um ein Homodimer handelt. Dagegen konnte keines der Multimerisierungsderivate durch den anti-MFOR_2-Antikörper erkannt werden, was die Fähigkeit zur Multimerisierung der MFOR_2-Untereinheit auch in Verbindung mit anderen Untereinheiten weitgehend ausschließt.

Die Zuordnung der *mfor_3*-kodierte Untereinheit war auf diesem Weg nicht möglich, da die schwache Expression dieses Proteins im bakteriellen System die Produktion von Antikörpern nicht ermöglichte. Es kann daher nicht ausgeschlossen werden, dass diese Untereinheit möglicherweise die ca. 70 kDa große Hauptbande bildet bzw. an der Multimerisierung der kleinen Untereinheiten beteiligt ist. Außerdem soll an dieser Stelle noch einmal auf potentielle

weitere Forisomen-Gene hingewiesen werden, deren Zuordnung ebenfalls untersucht werden muss.

Analyse der Reaktion des anti-vf-Antikörpers gegen Proteine aufgetrennter *V. faba*-Forisome
Vergleicht man die Reaktion des anti-MFOR_1-Antikörpers (Abb. 19 A, Spur 3) mit der Reaktion des anti-vf-Antikörpers (Abb. 19 A, Spur 5), zeigt sich ein beinahe identisches Bandenmuster. Auffällig dabei ist die Detektion der vier kleineren Banden im Bereich von ca. 70 kDa, sowohl durch den anti-vf-Antikörper als auch durch den anti-MFOR_1-Antikörper, während die eigentliche Hauptbande (Abb. 19 A, Spur 2, b) durch beide Immunsereen nicht eindeutig erkannt wird. Für die Immunisierung der Maus wurde allerdings die Hauptbande bei ca. 70 kDa als Antigen verwendet. Das Bandenmuster der Western-Blot-Analyse lässt also darauf schließen, dass das mengenmäßig stärkste Protein aufgereinigter *V. faba*-Forisome nicht immunogen ist, während Abbauprodukte bzw. Prozessierungen dieser Untereinheit(en) eindeutig erkannt werden. Aufgrund der Tatsache, dass ein übereinstimmendes Bandenmuster der Western-Blot-Analyse des anti-MFOR_1-Antikörpers zur Immunodetektion des anti-vf-Antikörpers beobachtet werden kann, lässt darauf schließen, dass zumindest ein Teil der 70 kDa großen Hauptbande aufgereinigter *V. faba*-Forisome von der Untereinheit MFOR_1 gebildet wird.

Die mögliche Zuordnung der Ca²⁺-reaktiven Bande

Versuche zur Identifizierung der Ca²⁺-reaktiven Untereinheit mittels der polyklonalen Antikörper anti-MFOR_1 und anti-MFOR_2 waren aufgrund der beschriebenen Unklarheiten in der Zuordnung der Proteine aufgetrennter Forisome zu den rekombinant hergestellten Untereinheiten und damit den Forisomen-Genen nicht eindeutig möglich. In weiterführenden Experimenten soll durch spezifische Insertions- oder Deletionsmutagenesen die Ausbildung der amphipatischen α -Helix verhindert werden. Dies könnte Aussagen über die Rolle der *coiled coil* Domäne des *mfor_2*-kodierte Proteins bei der Ca²⁺-Reaktion der Forisome ermöglichen.

Immunodetektion nativer Forisome durch die Antikörper der rekombinant hergestellten UE

Für die Analysen der polyklonalen anti-MFOR_1- und anti-MFOR_2-Antikörper wurden native *V. faba*-Forisome eingesetzt, da das prä-immun-Serum des anti-MFOR_2-Antikörpers in der Western-Blot-Analyse bereits ein Protein aufgereinigter *C. gladiata*-Forisome detektiert. Darüber hinaus besitzen Forisome von *V. faba* im Gegensatz zu den Proteinkörpern

von *C. gladiata* keine schwanzartigen Fortsätze und lassen sich somit möglicherweise auf struktureller Ebene besser mit den Forisomen von *M. truncatula* vergleichen, die dieses Strukturmerkmal ebenfalls nicht aufweisen.

Es konnte mittels Immunofluoreszenz eindeutig gezeigt werden, dass native *V. faba*-Forisome durch den anti-MFOR_1-Antikörper detektiert werden. Allerdings fluoreszierten Forisome in der vollständig kondensierten Konformation signifikant schwächer als Forisome, die offensichtlich aufgrund des für die Proteinkörper unphysiologischen Mediums leicht dispergiert vorlagen. Möglicherweise erleichtert der schwach dispergierte Zustand der Forisome die Bindung des Antikörpers an seine Epitope. Denkbar wäre auch, dass die dispergierte Konformation der Forisome auf eine anfängliche Denaturierung der Proteinkörper hinweist und erst daraufhin die Bindung des anti-MFOR_1-Antikörpers erfolgen kann. Die Maskierung des gesamten Proteinkörpers durch diesen Antikörper deutet auf einen hohen Anteil der *mfor_1*-kodierte Untereinheit im Forisom. Möglicherweise bildet die Untereinheit MFOR_1 die strukturbildende Hülle der Forisome.

Die Detektion nativer *V. faba*-Forisome durch den polyklonalen anti-MFOR_2-Antikörper konnte dagegen verstärkt an kondensierten Forisomen beobachtet werden. Die Bindung des Immunserums erfolgte punktuell, verstärkt an den Spitzen hervorstehender faserartiger Strukturen der Proteinkörper. Eine Haftung ko-aufgereinigter Membranpartikel an diesen exponierten Stellen, verbunden mit einer unspezifischen Bindung des Antikörpers an Proteine dieser Membranreste, kann nicht vollständig ausgeschlossen werden. Allerdings zeigen die Forisome des prä-immun-Serums keine vergleichbare Fluoreszenz.

Möglicherweise werden die Epitope des anti-MFOR_2-Antikörpers nur dann exponiert, wenn die faserartigen Strukturen der Forisome kondensiert vorliegen. Des Weiteren würde die Färbung eines nur sehr geringen Anteils der Proteine des Komplexes mit der im Vergleich zum anti-MFOR_1-Antikörper relativ schwachen Detektion der Western-Blot-Analysen korrelieren.

Mögliche Immunodetektion der Forisome mittels Antikörper potentieller rekombinanter Untereinheiten

Die Optimierung der Expression von GST-MFOR_3-Fusionsprotein bzw. von spezifischen MFOR_3-Deletionsderivaten soll künftig die Produktion polyklonaler Antikörper gegen diese Untereinheit ermöglichen. Des Weiteren wäre auch die Expression potentieller weiterer Forisomen-Gene in der Produktion von Antikörpern erforderlich. Möglicherweise ergeben

sich daraufhin neue Einblicke in den Aufbau der Forisome. Weiterhin wäre eine genauere Analyse der Antikörperbindung mittels elektronenmikroskopischer Aufnahmen, nach Einbettung der Forisome und Verwendung eines sekundären Immunogold-Antikörpers, denkbar.

4.5. DIE PROMOTOREN DER FORISOMEN-GENE

Die Forisome der Fabaceen wurden bisher fast ausschließlich in Siebelementen, selten auch in Geleitzellen des Phloems beobachtet. Basierend auf diesen Beobachtungen lag allen Studien die Vermutung zugrunde, dass die Aktivität der Forisomen-Promotoren *prom/mfor_1*, *prom/mfor_2* und *prom/mfor_3* auf die Bereiche des Phloems beschränkt ist.

Mit Hilfe des Reporterenzym β -Glukuronidase aus *E. coli* unter Kontrolle der drei Forisomen-Promotoren wurde zuerst in Protoplasten überprüft, ob es sich tatsächlich um aktive Promotoren handelt. Die transiente Expression der β -Glukuronidase in Protoplasten ergab dabei signifikante Unterschiede in der Aktivität der drei Forisomen-Promotoren. Als Vergleich diente der phloemspezifische virale CFDV-Promotor (Hehn und Rohde, 1998), so dass für *prom/mfor_3* die höchste Aktivität mit 47 %, für *prom/mfor_1* eine Aktivität von 20 % und für den schwächsten Promotor *prom/mfor_2* eine Aktivität von 8 % verzeichnet werden konnte.

Die Analyse transgener Pflanzen

Die stabile Integration der Promotor-GUS-Konstrukte ins Tabakgenom und die Generierung transgener Pflanzen ermöglichte die Verortung der Aktivität der Forisomen-Promotoren. Bereits erste Analysen nach Färbung der Blätter transgener Pflanzen aus Sterilkultur mit dem chromogenen Substrat X-Gluc ergaben, dass die Forisomen-Promotoren *prom/mfor_1*, *prom/mfor_2* und *prom/mfor_3* eine phloemspezifische Aktivität aufweisen (Abb. 17).

Darüber hinaus wurde mittels dieser Färbung ersichtlich, dass die Promotoraktivität in der Pflanze nicht mit der bereits ermittelten Aktivität in Protoplasten korreliert. Die schwächste Expression der β -Glukuronidase erfolgte in transgenen Pflanzen unter Kontrolle des Promotors *prom/mfor_3*, resultierend in einer nur leichten Blaufärbung der Blattadern (Abb. 17). Dagegen zeigten *prom/mfor_1*-transgene Tabakpflanzen eine wesentlich intensivere Blaufärbung der Blattnervatur, die noch deutlich gesteigert bei Pflanzen des Konstruktes *prom/mfor_2* zu beobachten war.

Auffällig war die signifikante und vor allem schnelle Färbung des Leitgewebes von *prom/mfor_2*-transgenen Pflanzen in Bereichen des Blattes, die durch mechanische Einflüsse

verletzt wurden. Dieses Phänomen konnte für Pflanzen der beiden anderen Promotor-Konstrukte *prom/mfor_1* und *prom/mfor_3* nicht beobachtet werden. Möglicherweise ist die generell sehr starke Expression der β -Glukuronidase unter Kontrolle des *prom/mfor_2* Resultat einer Weiterleitung der Verwundungsreaktion, die sich über die gesamten Phloembahnen erstreckt. Dies würde auch die schwache Expression der β -Glukuronidase unter Kontrolle des Promotors *prom/mfor_2* in Protoplasten erklären, da in diesem System kein Verwundungssignal zu erwarten ist.

Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass diese schnelle und intensive Färbung der verletzten Bereiche durch das erleichterte Eindringen des Farbstoffes bedingt ist, so dass die Aussage einer Wundinduzierbarkeit des Forisomen-spezifischen Promotors *prom/mfor_2* hier zunächst Vermutung bleiben muss.

Verortung der Promotoraktivität

Nach der Färbung von Quer- und Längsschnitten der Leitgewebe in Blattstielen transgener Tabakpflanzen konnte die Expression der β -Glukuronidase unter Kontrolle der Promotoren *prom/mfor_1*, *prom/mfor_2* und *prom/mfor_3* eindeutig in den Zellen des Phloems lokalisiert werden (Abb. 18). Allerdings erfolgt durch die Entfärbung des Blattgrüns mittels Methanol eine Beschädigung der Zellen, weshalb der Farbstoff von Orten der Expression in benachbarte Zellen diffundiert. Daher ist eine Aussage über die exakte Lokalisation der Promotor-Aktivität – in Siebelementen oder in Geleitzellen – mittels dieses Verfahrens nicht möglich.

In der Literatur wird die Bildung der kristallinen P-Proteine (Forisome) für Siebelemente der frühen Entwicklungsstadien beschrieben (Esau, 1971). Erste Akkumulationen granulären und fibrillären Materials in räumlicher Nähe zu Ribosomen junger Siebelemente stellen demzufolge die Vorstufen der Forisome dar. Dementsprechend könnten die Blaufärbung des Phloems der transgenen Pflanzen und damit die Aktivität der Forisomen-Promotoren auf junge, zur Proteinbiosynthese noch fähige Siebelemente beschränkt sein. Die teilweise lückenhafte Färbung der Phloembahnen, wie sie beispielsweise für Pflanzen des Konstruktes *prom/mfor_1* häufig beobachtet wurde, beschränkte sich möglicherweise auf Bereiche, in denen neues Phloem aufgrund des Größenwachstums der Pflanze gebildet wird.

Dagegen resultiert speziell die starke Expression der β -Glukuronidase unter Kontrolle des Promotors *prom/mfor_2* in einer häufig durchgängigen Färbung der Phloembahnen. Eine Aktivität dieses Promotors könnte daher eher in den Geleitzellen lokalisiert sein, die im ausdifferenzierten Stadium der Siebelemente deren Proteinbiosynthese übernehmen. Die

Bildung einer oder mehrerer Untereinheiten der Forisome in der Geleitzelle und der Transport dieser Proteine durch die PPU's ins Siebelement – wie es für mehrere Proteine bereits beschrieben wurde (Fisher *et al.*, 1992) – wäre ebenfalls denkbar.

Die Konformationsänderung isolierter Forisome *in vitro* kann durch Zugabe von Ca^{2+} , bzw. EDTA mehrmals wiederholt werden. Allerdings wurde ebenfalls beobachtet, dass nach einigen Reaktionszyklen die vollständige Konformationsänderung der Proteinkörper in den kondensierten bzw. dispergierten Zustand nicht mehr möglich ist. Offensichtlich werden die Forisomen bei jeder Reaktion leicht „beschädigt“ (Daten nicht gezeigt). Die Nachlieferung einer oder mehrerer Untereinheiten der Forisome nach Verletzung und Reorganisation des Siebelements aus der Geleitzelle wäre denkbar und würde die Hypothese der Wundinduzierbarkeit des Promotors *prom/mfor_2* unterstützen.

In elektronenmikroskopischen Aufnahmen wird eine strukturelle Ähnlichkeit der strukturellen P-Proteine zu den kristallinen P-Proteinen (Forisomen) deutlich (Arsanto, 1982). Des Weiteren wurde sowohl für die P-Proteine als auch für die Forisome die Funktion des Wundverschlusses beschrieben (Knoblauch und van Bel, 1998; Knoblauch *et al.*, 2001). Dies gibt Anlass zur Vermutung, dass eine oder mehrere der Untereinheiten, die am Aufbau der Forisome beteiligt sind, bei der Bildung der strukturellen P-Proteine ebenfalls eine Rolle spielen. Möglicherweise beschränkt sich die Bildung der Forisome lediglich auf den „Einbau“ zusätzlicher Untereinheiten in das Grundgerüst der P-Proteine. Elektronenmikroskopische Aufnahmen der kristallinen P-Proteine (Forisome) zeigen die Anlagerung von strukturellen P-Protein-Fasern an die kristallinen P-Proteinkörper (Arsanto, 1982), was auf einen evolutiven Zusammenhang und den möglichen Aufbau beider Proteine aus identischen Untereinheiten hinweisen könnte. Die Funktion des Wundverschlusses beider Phloemkomponenten könnte die Proteinbiosynthese einzelner Untereinheiten in der Geleitzelle sowie ihren anschließenden Transport in das Siebelement für die Reparatur der Proteine erklären. In diesem Fall wäre die Aktivität der Promotoren *prom/mfor_1*, *prom/mfor_2* und *prom/mfor_3* in den Geleitzellen zu verorten.

Denkbar wäre ebenfalls eine Kombination beider Hypothesen. So könnte das Grundgerüst der Forisome in jungen Siebelementen gebildet werden, während die funktionelle, Ca^{2+} -reaktive Untereinheit erst nach Ausdifferenzierung der Siebelemente aus den Geleitzellen nachgeliefert werden würde. Mehrere Autoren (Wergin und Newcomb, 1970; Wergin *et al.*, 1975) beobachteten kondensierte kristalline P-Proteine (Forisome) in jungen Siebelementen der Fabaceen, während für ausdifferenzierte Siebelemente die dispergierte Konformation der

Proteinkörper beschrieben wurde (Wergin und Newcomb, 1970; Palevitz und Newcomb, 1971). Später stellte sich heraus, dass lediglich die Präparation für die Elektronenmikroskopie zur Dispersion der kristallinen P-Proteine führte (Fisher, 1975; Lawton 1978b). Die Beschreibung der kondensierten Form der Proteinkörper in jungen SE und der dispergierten Form in ausdifferenzierten SE bei gleicher Fixierung lässt die Schlussfolgerung zu, dass die Forisome in Siebelementen früherer Entwicklungsstadien zwar strukturell vorhanden, jedoch noch nicht reaktiv vorliegen. Somit könnte die Promotor-Aktivität des Forisomen-Gens der Ca^{2+} -reaktive Untereinheit in den Geleitzellen ausdifferenzierter Siebelemente lokalisiert sein.

Weiterführende Studien zur Verortung der Promotoraktivität

Im Hinblick auf die Aufklärung des Bildungsortes der Forisome mittels exakter Verortung der Promotoraktivität wären weitere Studien angeraten.

Eine Fixierung der Quer- bzw. Längsschnitte würde die Diffusion des Farbstoffes ins umliegende Gewebe verhindern und somit eine exakte Lokalisierung der Aktivität der einzelnen Promotoren in Siebelement oder Geleitzelle ermöglichen. Die Expression verschiedener fluoreszierender Reporterenzyme (bspw.: GFP, YFP, DSRred) unter Kontrolle der einzelnen Forisomen-Promotoren würde die Beobachtung der Promotoraktivität *in vivo* erlauben. Daraus würde ersichtlich, ob alle drei Promotoren zeitgleich in einer Zelle aktiv sind, oder ob deren Aktivität möglicherweise entwicklungsspezifisch ist. Des Weiteren könnten detailliertere Aussagen über eine mögliche Wundinduzierbarkeit des Promotors *prom/mfor_2* getroffen werden.

Zudem sollte die Analyse der Promotoren potentiell weiterer Forisomen-Gene (4.3.) hinsichtlich ihrer Aktivität und Gewebespezifität erfolgen.

4.6. DIE KALZIUM-REAKTION DER FORISOME – EIN MÖGLICHES MODELL

Der Entwurf eines Modells zur Konformationsänderung der Forisome erfolgt auf Grundlage einer Verbindung bereits publizierter Daten mit den in dieser Arbeit beschriebenen molekularen Erkenntnissen, die hier kurz skizziert werden:

- Der Proteinkomplex „Forisom“ reagiert *in vivo* und *in vitro* mit einer reversiblen Konformationsänderung vom kondensierten in den dispergierten Zustand nach Zugabe von Kalziumionen ins umgebende Medium (Knoblauch *et al.*, 2001; 2003).

- Nach Veränderungen des physiologischen pH-Wertes des Mediums konnte eine vergleichbare Konformationsänderung der Forisome beobachtet werden (Knoblauch *et al.*, 2003; beschrieben im nachfolgenden Exkurs).
- Die Forisomen-Gene *mfor_1*, *mfor_2* und *mfor_3* kodieren für Proteine, deren einzig bekanntes Sequenzmotiv die *coiled coil* Domäne der *mfor_2*-kodierten Untereinheit darstellt.
- Für eine der Untereinheiten, die am Aufbau der Proteinkomplexe beteiligt sind, konnte mittels des *mobility shift assay* eine Ca^{2+} -Reaktion nachgewiesen werden.

Die Entwicklung eines Modells kann an dieser Stelle jedoch lediglich vorläufigen Charakter besitzen.

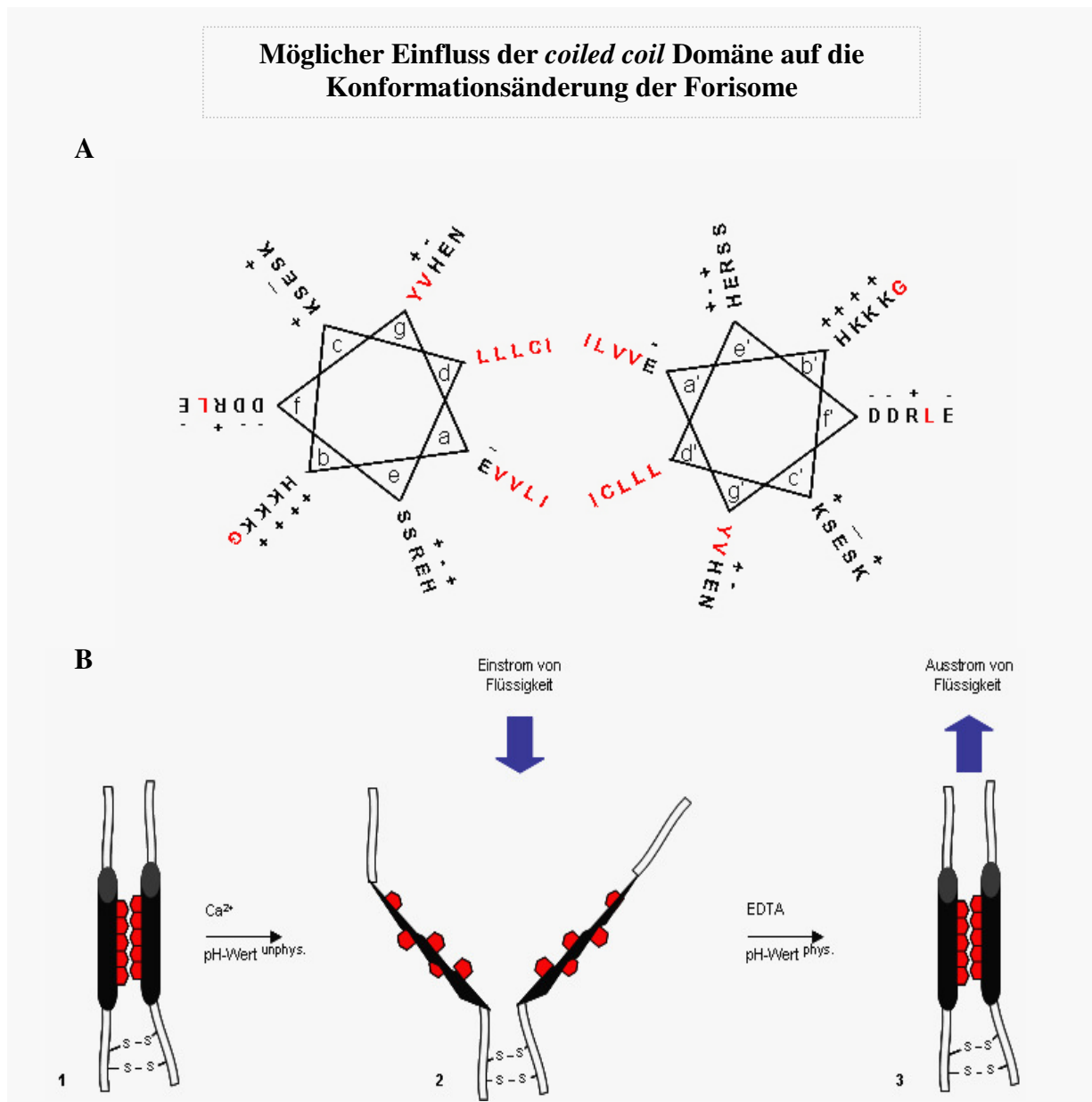


Abb. 20: Modell zur Reaktion der *coiled coil* Domäne der Forisomen-Untereinheit MFOR_2 auf Zugabe von Ca^{2+} und Veränderungen des pH-Wertes

(A) Mögliche Zusammenlagerung von zwei amphipatischen α -Helices der *coiled coil*

Domänen in eindimensionaler Darstellung. Die hydrophoben Aminosäuren (rot gekennzeichnet) induzieren die Ausbildung eines hydrophoben Kerns. Die Ladung der Aminosäuren bei physiologischem pH-Wert ist angegeben.

(B) 1) Hydrophobe Interaktion der *coiled coil* Domänen bildet einen hydrophoben Kern

bei physiologischem pH-Wert. Die mögliche kovalente Bindung der beiden MFOR_2-Untereinheiten über Disulfidbrücken der beschriebenen carboxyterminalen Cysteine stabilisiert das Homodimer.

2) Umfaltung der beiden amphipatischen α -Helices nach Interaktion der Untereinheit

MFOR_2 mit Ca^{2+} oder nach Veränderungen des pH-Wertes im umgebenen Medium. Dadurch bedingte Auflösung des hydrophoben Kerns, in deren Folge Flüssigkeit einströmen kann.

3) Rückfaltung der der beiden amphipatischen α -Helices nach Zugabe des Chelators

EDTA oder nach Wiedereinstellung des physiologischen pH-Wertes. Verdrängung der Flüssigkeit aufgrund erneuter Ausbildung des hydrophoben Kerns.

Bei einem physiologischen pH-Wert bildet die *coiled coil* Domäne der *mfor_2*-kodierten Forisomen-Untereinheit eine amphipatische α -Helix aus. Die wahrscheinliche Interaktion der hydrophoben Aminosäuren von zwei oder mehreren dieser α -Helices induziert die Ausbildung des hydrophoben Kerns der *coiled coils* (Abb. 20 A, B1). Die dadurch bedingte Oligomerisierung der Untereinheit MFOR_2 könnte ursächlich den kondensierten Konformationszustand der Forisome bedingen.

Erste Hypothesen zur Ursache der Konformationsänderung der Forisome basieren auf einer Neutralisierung von Ladungen der Aminosäureseitenketten durch Anlagerung von Kalziumionen. Die damit verbundene Auflösung der ionischen Interaktion der Polypeptidketten würde in der Folge zur Auflösung der faserartigen Struktur der Proteinkörper führen (Pickard *et al.*, 2005; Knoblauch und Peters, 2004).

Denkbar wäre dementsprechend die Interaktion der Kalziumionen mit negativen Ladungen der Aminosäureseitenketten des hydrophilen Teils der α -Helix oder der gesamten Polypeptidkette. Eine solche Ladungsverschiebung hätte vermutlich die Umfaltung der amphipatischen α -Helices und die Auflösung des hydrophoben Kerns dieser Module zur

Folge (Abb. 20 B2). Der Influx von Flüssigkeit in die zuvor hydrophoben Bereiche würde die signifikante Volumenzunahme der Proteinkörper um 130% des dispergierten Konformationszustands erklären. Betrachtet man diesbezüglich die punktuelle Detektion des anti-MFOR_2-Antikörpers an Spitzen der faserartigen Strukturen ausschließlich im kondensierten Konformationszustand (Abb.15F), wären diese „MFOR_2-Module“ an Schlüsselpositionen lokalisiert. Die Zugabe von Ca^{2+} könnte den Zusammenhalt der faserartigen Struktur der Forisome auflösen, woraufhin der Flüssigkeitsinflux erfolgen würde. Die Entziehung des Ca^{2+} durch Zugabe eines Chelators (EDTA) resultiert wahrscheinlich in der Rückfaltung der amphipatischen α -Helices (Abb. 20 B3) gewährleistet etwa durch die kovalente Bindung der MFOR_2-Untereinheiten über die Disulfidbrücken der carboxyterminalen Cysteine. Die dichte Packung der Forisome aufgrund der hydrophoben Interaktion der Aminosäuren der α -Helices und die damit verbundene Verdrängung der Flüssigkeit ermöglicht möglicherweise die Rückreaktion der Forisome in die kondensierte Konformation.

Die Beobachtung, dass die Bindung des Ca^{2+} an die dispergierten Forisome mittels schwacher Chelatoren wie beispielsweise Citrat und ATP kompetitiert werden kann (U. Spohn, persönliche Mitteilung) zeigt, dass es sich um eine sehr schwache Bindung dieses zweiwertigen Kations durch die Forisome handelt. Selbst die Zugabe von Ca^{2+} -haltigem Medium, dessen Konzentration unterhalb des reaktionsauslösenden Schwellenwertes liegt, führt zum schrittweisen Rückgang der Forisome in den kondensierten Zustand (Daten nicht gezeigt). Diese Beobachtungen unterstützen die Vorstellung, dass die Reaktion der Forisome auf Ca^{2+} tatsächlich auf einer Ladungsverschiebung und nicht auf einer relativ starken Bindung, wie etwa durch ein spezifisches Ca^{2+} -Bindungsmotiv, handelt.

Der Einfluss von ionischen Wechselwirkungen auf die hydrophobe Interaktion der *coiled coil* Domänen wurde bereits für die Dimerisierung der *coiled coil* Domäne von Tropomyosin beschrieben (Farah und Reinach, 1999). Darüber hinaus können auch Verschiebungen des pH-Wertes ursächlich für die hydrophobe Interaktion der *coiled coil* Domänen sein (Suzuki *et al.*, 1997). Die Tatsache, dass die Konformationsänderung der Forisome nicht ausschließlich durch Ca^{2+} , sondern auch durch Verschiebungen des physiologischen pH-Wertes induziert werden kann, wurde bisher lediglich kurz erwähnt. Daher soll zur Präzisierung des oben vorgestellten Modells die pH-induzierte Konformationsänderung der Forisome im folgenden Exkurs beschrieben werden.

In vitro-Studien von Knoblauch *et al.* (2003) zeigen, dass Abweichungen vom physiologischen pH-Wert des Siebelementes (ca. 7,3), sowohl in den sauren als auch in den basischen Bereich in einer Dispersion der Forisome resultieren, wobei es sich hierbei um eine unphysiologische Reaktion handelt. Im Bereich von pH 9,6 bis 10,6 kommt es zu einer schrittweisen Konformationsänderung der Proteinkörper, ähnlich einer Quellung, die allerdings bei 10,6 das Ausmaß der Kalzium-Reaktion erreicht. Im sauren Milieu ist diese Reaktion auf ein pH-Spektrum von pH 4,9 bis 4,6 begrenzt und zeigt einen vergleichbaren Verlauf wie im basischen Bereich. In beiden beschriebenen Fällen ist die Konformationsänderung der Proteinkörper nach Einstellung des physiologischen pH-Wertes vollständig reversibel. Erreicht man jedoch Werte von pH 10,9 bzw. 4,5, erfolgt die Denaturierung der Proteine und eine Rückreaktion der Forisome in den kondensierten Zustand ist nicht mehr möglich.

Eine pH-induzierte Reaktion von Proteinen wird auch für das „major sperm protein“ (MSP) aus Spermatozoen des Nematoden *Ascaris suum* beschrieben, das für die amöboide Fortbewegung dieser Zellen verantwortlich ist (Italiano *et al.*, 1999). pH-Verschiebungen resultieren dabei in der Polymerisation der MSP-Filamente im basischen und Depolymerisation derselben im sauren Bereich (Roberts und Stewart, 2000).

Die Reaktion der Forisome auf Veränderungen des pH-Wertes ließe sich somit ebenfalls auf eine Umfaltung der *coiled coil* Domänen zurückführen. Verschiebungen des pH-Wertes in den sauren Bereich führen zu einer Protonierung der negativ geladenen Carboxylgruppen der Aminosäureseitenketten. Analog dazu würde ein stark basischer pH-Wert von 9,6, wie er für die Dispersion der Forisome notwendig ist, zur Deprotonierung der Aminogruppen führen. In beiden Fällen könnte, basierend auf der Neutralisierung dieser Ladungen, eine Verschiebung der Interaktionen der Aminosäuren erfolgen. Eine Umfaltung der α -Helices, wie nach Bindung von Ca^{2+} , wäre auch durch Veränderungen des pH-Wertes denkbar. Die Auflösung des hydrophoben Kerns, der Einstrom von Flüssigkeit in den Proteinkörper und die dadurch ermöglichte Dispersion der Forisome könnte demzufolge nach dem gleichen Prinzip wie die Ca^{2+} -Reaktion erfolgen.

Keine der bisher untersuchten Untereinheiten der Forisome weist eines der in der Einleitung beschriebenen Ca^{2+} -Bindungsmotive auf, wie es in Form zweier EF-Hand-Motive für die Ca^{2+} -bindenden Proteine der Spasmoneme der Fall ist. Obwohl die Spasmoneme vergleichbare, kontraktile Proteinkomplexe darstellen, die – wie die Forisome – auf Ca^{2+} mit einer reversiblen Konformationsänderung reagieren, scheint sich der molekulare Mechanismus von dem der Forisome zu unterscheiden.

Das auf dem *coiled coil* Motiv der Forsiomen-Untereinheit MFOR_2 basierende Modell ist in der Lage sowohl die Ca^{2+} -Reaktion als auch die für die Spasmoneme nicht beschriebene pH-Reaktion der Forisome zu erklären.

In der vorliegenden Arbeit wurden erste Erkenntnisse zum molekularen Aufbau phloemspezifischer Strukturproteine der Familie der Fabaceen beschrieben. Diese, als Forisome bezeichneten Proteine, reagieren auf die Zugabe zweiwertiger Kationen wie Ca^{2+} und auf Veränderungen des pH-Wertes im umgebenden Medium sowohl *in vivo* als auch *in vitro* mit einer Konformationsänderung von einem spindelförmigen, kondensierten in einen abgerundeten, dispergierten Zustand. Die Aufreinigung der Proteinkomplexe aus *Vicia faba* und *Canavalia gladiata* ermöglichte die Generierung von Peptidsequenzen einzelner Untereinheiten der Forisome, auf deren Basis die Klonierung der Forisomen-Gene *mfor_1-3* von *Medicago truncatula* erfolgte. Dies ermöglichte die Herstellung rekombinanter Proteine und polyklonaler Antiseren, wodurch ein eindeutiger Nachweis der Zugehörigkeit der durch *mfor_1-3* kodierten Proteine zu den Forisomen erbracht werden konnte. Die Aktivität der korrespondierenden Promotoren konnte ausschließlich im Phloem transgener Pflanzen lokalisiert werden – dem natürlichen Bildungsort der Forisome. Unter Verwendung dieser experimentellen Daten konnte schließlich ein vorläufiges Modell zur Kalzium-Reaktivität der Forisome entwickelt werden.

Die Optimierung der SDS-PAGEs aufgereinigter, denaturierter Forisome resultierte in der Auftrennung dreier Proteine mit Molekulargewichten von ca. 70 kDa, allerdings erst nach Zugabe von Ca^{2+} ins SDS-PAA-Gel. Die Veränderung des Laufverhaltens einer Untereinheit, möglicherweise aufgrund einer Ca^{2+} -induzierten Konformationsänderung des Proteins, gewährleistet die optische Trennung der drei Banden bei ca. 70 kDa. Des Weiteren lässt das Bandenmuster der hochmolekularen Proteine auf die Di- bzw. Multimerisierung der Untereinheiten schließen. Der Abgleich von generierten Peptidsequenzen der 70 kDa großen Proteine der *V. faba*-Forisome mit öffentlich zugänglichen Datenbanken ermöglichte die Klonierung der Forisomen-Gene *mfor_1*, *mfor_2* und *mfor_3*. Sequenzanalysen zeigen, dass es sich bei den Forisomen-Genen um eine neue Genfamilie handelt, deren Mitglieder eine ca. 60%ige Homologie untereinander aufweisen, allerdings keine signifikanten Homologien zu bereits publizierten Sequenzen zeigen.

Die rekombinante Herstellung der drei Forisomen-Proteine MFOR_1, MFOR_2 und MFOR_3 im bakteriellen System ermöglichte die Produktion der polyklonalen Antikörper anti-MFOR_1 und anti-MFOR_2. Bedingt durch die lediglich geringe Expression von

MFOR_3 im bakteriellen System, stand für diese Untereinheit kein Antiserum zur Verfügung. Daher wurde die 70 kDa-Untereinheit von *V. faba* und *C. gladiata* für die Immunisierung von Mäusen eingesetzt. Die Detektion von rekombinant hergestellten MFOR_3 durch die anti-vf- und anti-can-Antikörper ermöglichte die Zuordnung der Untereinheit MFOR_3 zu den Forisomen. Darüber hinaus konnten mit Hilfe der Antikörper der rekombinanten Untereinheiten MFOR_1 und MFOR_2 sowohl Proteine der über SDS-PAGE aufgereinigten Forisome als auch native Forisome detektiert werden. So wurde für alle drei rekombinant hergestellten Proteine der Nachweis erbracht, dass sie am Aufbau der Forisome beteiligt sind.

Nach Klonierung der drei Forisomen-Promotoren *prom/mfor_1*, *prom/mfor_2* und *prom/mfor_3* konnte ihre Aktivität in Tabakprotoplasten nachgewiesen werden. Die Verortung der Promotoraktivität hinsichtlich der Frage nach dem Bildungsort der Forisome erfolgte durch die Verwendung des Reporterenzym β -Glukuronidase. Die stabile Integration der Promotor-GUS-Konstrukte ins Tabakgenom und die Regeneration transgener Pflanzen zeigte die Phloemspezifität aller drei Promotoren.

Keine der drei Forisomen-Untereinheiten zeigte nach Sequenzanalyse ein bekanntes Ca^{2+} -Bindungsmotiv. Allerdings konnte für die Untereinheit MFOR_2 eine *coiled coil* Domäne identifiziert und damit die Ausbildung einer amphipatischen α -Helix nachgewiesen werden. Eine sorgfältige Analyse aller Experimente bezüglich der physiologischen und molekularen Daten der Forisome erlaubte den Entwurf eines Modells zur Erklärung der Konformationsänderung der Proteinkomplexe. Grundlage dieses Modells bildet die hydrophobe Interaktion der *coiled coil* Domänen, die damit einhergehende Oligomerisierung der Untereinheit MFOR_2 und die durch Neutralisierung geladener Aminosäuren induzierte Umfaltung der *coiled coil* Struktur. Mit Hilfe dieses Modells ist sowohl die Ca^{2+} -induzierte als auch die pH-abhängige Konformationsänderung der Forisome erklärbar.

- Allen, R.D.** (1973) Structures linking the myonemes, endoplasmic reticulum and surface membranes in the contractile ciliate *Vorticella*. *J. Cell Biol.* 56: 559-579
- Amos, W.B.** (1972) Structure and coiling of the stalk in the peritrich ciliates *Vorticella* and *Carchesium*. *J. Cell Sci.* 10: 95-122
- Amos, W.B.** (1975) Contraction and calcium binding in vorticellid ciliates. In: Stephens, R.E. and S. Inoué (Eds.) *Molecules and Cell Movement*. (Raven Press: New York, 411-436)
- Amos, W.B., Routledge, L.M. und Yew, F.F.** (1975) Calcium-binding proteins in the vorticellid contractile organelle. *J. Cell Sci.* 19: 203-212
- Amos, W.B., Routledge, L.M., Weis-Fogh, T. und Yew, F.F.** (1976) The spasmoneme and calcium-dependent contraction in connection with specific calcium binding proteins. In: Duncan, C.J. (Ed.) *Calcium in Biological Systems (Symposia of the Society for Experimental Biology 30)*. (Cambridge: Cambridge University Press, 273-301)
- Arsanto, J.P.** (1982) Observations on P-protein in Dicotyledons. substructural and developmental features. *Amer. J. Bot* 69: 1200-1212
- Arsanto, J.P.** (1986) Ca^{2+} -binding sites and phosphatase activities in sieve element reticulum and P-protein of chick-pea phloem. A cytochemical and x-ray microanalysis survey. *Protoplasma* 132: 160-171
- Asai, H., Ochiai, T., Fukui, K., Watanabe, M. und Kano, F.** (1978) Improved preparation and cooperative calcium contraction of glycerinated *Vorticella*. *J. Biochem.* 83: 795-798
- Asai, H., Nakamura, K., Hosoda, K. und Shindoh, Y.** (1995) Amino acid analysis of a 20 kDa calcium-binding protein (spasmin) from *Carchesium* stalks. In: Asai, H. und Naitoh, Y. (Eds.) *Proceedings of the 4th Asian Conference of Ciliate Molecular Biology and the International Symposium on Cell Motility and Cytogenesis*. (Kyoyu Printing Co., Ltd: Tokyo Japan, 171-175)
- Askerlund, P. und Sommarin, M.** (1996) Calcium efflux transporters in higher plants. In: Smallwood, M., Knox, J.P. und Bowles, D.J. *Membranes (Eds.) Specialized Functions in Plants*. (BIOS Scientific Publishers: Oxford, UK, 281-299)

- Bailey, I.W.** (1923) Slime bodies of Robina Pseudo-Acacia L. *Phytopatholgy* 13: 332-333
- Barnes, W.M.** (1994) PCR amplification of up to 35-kb DNA with high fidelity and high yield from λ bacteriophage templates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 2216-2220
- Bateman, A., Birney, E., Durbin, R., Eddy, S.R., Howe, K.L. und Sonnhammer, E.L.L.** (2000) The Pfam protein families database. *Nucl. Acids Res.* 28: 263-266
- Behnke, H.-D.** (1981) Sieve-element characters. *Nord. J. Bot.* 1: 381-400
- Behnke, H.-D.** (1991) Distribution and evolution of forms and types of sieve-element plastids in the dicotyledons. *Aliso* 13: 167-182
- Behnke, H.-D. und Sjolund, R.D.** (Eds.) (1990) Sieve elements: comparative structure, induction and development. (Springer: Berlin, Heidelberg, New York)
- Behnke, H.-D., Kiritsis, U., Patrick, S.J. und Kenneally, K.F.** (1996) Form-Pfs plastids, stem anatomy and systematic affinities of *Stylobasium* Desf. (Stylobasiaceae). A contribution to the knowledge of sieve-element plastids in the Rutales and Sapindales. *Bot. Acta* 109: 346-359
- Bevan, M.** (1984) Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation. *Nucl. Acids Res.* 12: 8711-8721
- Bradford, M.M.** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254
- Burkhard, P., Stetefeld, J. und Strelkov, S.V.** (2001) Coiled coils: a highly versatile protein folding motif. *Trends Cell Biol.* 11: 82-88
- Bush, D.S.** (1995) Calcium regulation in higher plant cells and its role in signaling. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 46: 95-122
- Catesson, A.M.** (1980) Localization of phloem oxidases. *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* 93: 141-152

- Cheng, S., Fockler, C., Barnes, W.M. und Higuchi, R.** (1994) Effective amplification of long targets from cloned inserts and human genomic DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 5695-5699
- Crick, F.C.H.** (1953) The packing of α -helices: simple coiled coils. *Acta Crystallographica* 6: 689-697
- Cronshaw, J.** (1975) P-proteins. In: Aronoff, S., Dainty, J., Gorham, P.R., Srivastava, L., M. und Swanson, C.A. (Eds.) *Phloem Transport* (NATO Adv. Study Inst. Ser., Plenum Press: New York, London, 79-147)
- Devreux, J., Haeberli, P. und Smithies, O.** (1984) A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. *Nucl. Acids Res.* 12(1): 387-395
- Ehlers, K., Knoblauch, M. und van Bel, A.J.E.** (2000) Ultrastructural features of well-preserved and injured sieve elements: minute clamps keep the phloem transport conduits free for mass flow. *Protoplasma* 214: 80-92
- Esau, K.** (1969) The phloem. (*Encyclopedia of Plant Anatomy*). (Borntraeger: Berlin, Stuttgart)
- Esau, K.** (1971) Development of P-protein in sieve elements of *Mimosa pudica*. *Protoplasma* 73: 225-238
- Esau, K.** (1978) Developmental features of the primary phloem in *Phaseolus vulgaris* L. *Ann. Bot.* 42: 1-13
- Esau, K. und Gill, R.H.** (1971) Aggregation of endoplasmic reticulum and its relation to the nucleus in a differentiating sieve element. *J. Ultrastruct. Res.* 34: 144-158
- Esau, K. und Charvat, I.D.** (1975) An ultrastructural study of acid phosphatase localization in cells of *Phaseolus vulgaris* phloem by the use of the azo dye method. *Tissue Cell* 7: 619-630
- Esau, K. und Thorsch, J.** (1985) Sieve plate pores and plasmodesmata, the communication channels of the symplast: ultrastructural aspects and developmental relations. *Am. J. Bot.* 72: 1641-1653

- Evert, R.F.** (1990) Dicotyledons. In: Behnke H.-D. and Sjolund, R.D (Eds.) Sieve elements: comparative structure, induction and development. (Springer: Berlin, Heidelberg, New York, 103-137)
- Evert, R.F. und Deshpande, B.P.** (1970) Nuclear P protein in sieve elements of *Tilia Americana*. J. Cell Biol. 44: 462-666
- Farah, C.S. und Reinach, F.C.** (1999) Regulatory properties of recombinant tropomyosins containing 5- hydroxytryptophan: Ca²⁺-binding to troponin results in a conformational change in a region of tropomyosin outside the troponin binding bite. Biochemistry 38: 10543-10551
- Fisher, D.B.** (1975) Structure of functional soybean sieve elements. Plant Physiol. 56: 555-569
- Fisher, D.B., Wu, Y. und Ku, M.S.B.** (1992) Turnover of soluble proteins in the wheat sieve tube. Plant. Physiol. 100: 1433-1441
- Gilder, J. und Cronshaw, J.** (1973) Adenosine triphosphatase in the phloem of *Cucurbita*. Planta 110: 189-204
- Gilroy, S., Bethke, P.C. und Jones, R.L.** (1993) Calcium homeostasis in plants. J. Cell. Sci. 106: 453-462
- Hanahan, D.** (1985) In: Glover, D.M. (Ed.) DNA cloning-a practical approach. (IRL Press: Oxford, Vol.I, 109-135)
- Hartig, T.** (1837) Vergleichende Untersuchungen über die Organisation des Stammes der einheimischen Waldbäume. Jahresber. Fortschr. Forstwiss. Forstl. Naturkd. 1: 125-168
- Hawkes, R.B. and Rahat, M.** (1976) Contraction and volume reduction of glycerolated *Carchesium* spasmoneme: effects of alkali earth cations. Experientia 32: 160-162
- Hehn, A. und Rohde, W.** (1998) Characterization of cis-acting elements affecting strength and phloem specificity of the coconut foliar decay virus promoter. J. Gen. Virol. 79 : 1495-1499

- Hoeffert, L.L.** (1980) Ultrastructure of developing sieve elements in *Thalasspi arvense* L. II. Maturation. Am. J. Bot. 67: 194-201
- Hoekema, A., Hirsch, P., Hooykaas, P., Schilperoort, R.A.** (1983) A binary plant vector strategy based on separation of vir- and T- region of *A. tumefaciens*. Nature 303: 179-180
- Hoffman-Berling, H.** (1958) Der Mechanismus eines neuen, von der Muskelkontraktion verschiedenen Kontraktionszyklus. Biochem. Biophys. Act. 27: 247-255
- Imlau, A., Truernit, E. und Sauer, N.** (1999) Cell-to-cell and long-distance trafficking of the green fluorescent protein in the phloem and symplastic unloading of the protein into sink tissues. Plant Cell 11: 309-322
- Ishiwatari, Y., Honda, C., Kawashima I., Nakamura S.-I., Hirano, H., Mori, S., Fujiwara, T., Hayashi, H. und Chino, M.** (1995) Thioredoxin h is one of the major proteins in rice phloem sap. Planta 195: 456-463
- Italiano, Jr., J.E., Stewart, M. und Roberts, T.M.** (1999) Localized depolymerization of the major sperm protein cytoskeleton correlates with the forward movement of the cell body in the amoeboid movement of nematode sperm. J. Cell Biol. 146: 1087-1095
- Jefferson, R.A.** (1987) Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system. Plant Mol. Biol. Rep. 5: 387-405
- Jones, A.R., Jahn, T.L. und Fonseca, J.R.** (1970) Contraction of protoplasm. IV. Cinematographic analysis of the contraction of some peritrichs. J. Cell Physiol. 75: 9-20
- Kahl, C.R. und Means, A.R.** (2003) Regulation of cell cycle progression by calcium/calmodulin-dependent pathways. Endocrine Rev. 24: 719-736
- Kameshita, I., und Fujisawa, H.** (1997) Detection of calcium binding proteins by two-dimensional sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. Anal. Biochem. 249: 252-255
- Katoh, K. und Naitoh, Y.** (1994) Control of cellular contraction by calcium in *Vorticella*. J. Exp. Biol. 189: 163-177

- Katoh, K. und Kikuyama, M.** (1997) An all-or-nothing rise in cytosolic $[Ca^{2+}]$ in *Vorticella* sp. J. Exp. Biol. 200: 35-40
- Kawasaki, H., Nakayama, S. und Kretsinger, R.H.** (1998) Classification and evolution of EF-hand proteins. BioMetals 11: 277-295
- Kempers, R. und van Bel, A.J.E.** (1997) Symplasmic connections between sieve element and companion cell in the stem phloem of *Vicia faba* L. have a size exclusion limit of at least 10 kDa. Planta 201: 195-201
- Knoblauch, M.** (2000) Entwicklung neuer Methoden zur Untersuchung der Struktur und Funktion des Transportphloems *in vivo*. (Inaugural-Dissertation: JLU Gießen)
- Knoblauch, M. und van Bel, A.J.E.** (1998) Sieve tubes in action. Plant Cell 10: 35-50
- Knoblauch, M., Peters, W.S., Ehlers, K. und van Bel, A.J.E.** (2001) Reversible calcium-regulated stopcocks in legume sieve tubes. Plant Cell 13: 1221-1230
- Knoblauch, M., Noll, G.A., Müller, T., Prüfer, D., Schneider-Hüther I., Scharner D., van Bel, A.J.E. und Peters, W.S.** (2003) ATP-independent contractile proteins from plants. Nature Mater. 2: 600-6003
- Knoblauch, M. und Peters, W. S.** (2004) Forisomes, a novel type of Ca^{2+} -dependent contractile protein motor. Cell Mot. Cyt. 58: 137-142
- Knoblauch, M., Noll, G.A., Müller, T., Prüfer, D., Schneider-Hüther I., Scharner D., van Bel, A.J.E. und Peters, W.S.** (2005) Erratum. Nature Mater. 4: 353
- Krylov, D., Barchi, J. und Vinson, C.** (1998) Inter-helical interactions in the leucine zipper coiled coil dimer: pH and salt dependence of coupling energy between charged amino acids. J. Mol. Biol. 279: 959-972
- Laemmli, U.K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-685
- Landschulz, W.H., Johnson, P.F. und McKnight, S.L.** (1988) The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. Science 240: 1759-1764

- Lawton, D.M.** (1978a) Ultrastructural comparison of the tailed and tailless P-protein crystals respectively of runner bean (*Phaseolus multiflorus*) and garden pea (*Pisum sativum*) with tilting stage electron microscopy. *Protoplasma* 97: 1-11
- Lawton, D.M.** (1978b) P-protein crystals do not disperse in uninjured sieve elements in roots of runner bean (*Phaseolus multiflorus*) fixed with glutaraldehyde. *Ann. Bot.* 42: 353-361
- Lawton, D.M. und Newmann, Y.M.** (1979) Ultrastructure of phloem in young runner-bean stem: discovery, in old sieve elements on the brink of collapse, of parietal bundles of P-protein tubules linked to the plasmalemma. *New Phytol.* 82: 213-222
- Leiser, R.M., Ziegler-Graff, V., Reutenauer, A., Herrbach, E., Lemaire, O., Guilley, A., Richards, K. und, Jonard, G.** (1992) Agroinfection as an alternative to insects for infecting plants with beet western yellows luteovirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 9136 - 9140
- Levine, L.** (1956) Contractility of glycerinated vorticellae. *Bio. Bull.* 111: 319
- Lupas, A.** (1996) Coiled coils: new structures and new functions. *Trends Biochem. Sci.* 21: 375-382
- Maciejewski, J.J., Vacchiano, E.J., McCutcheon, S.M. und Buhse Jr., H.E.** (1999) Cloning and expression of a cDNA encoding a *Vorticella convallaria* spasmin: an EF-hand calcium-binding protein. *J. Euk. Microbiol.* 46: 165-173
- Mahadevan, L. und Matsudaira, P.** (2000) Motility powered by supramolecular springs and ratchets. *Science* 288: 95-99
- McArthur, I.** (1943) Structure of alpha-keratin. *Nature* 152: 38
- McEuen, A.R., Hart, J.W. und Sabnis, D.D.** (1981) Calcium-binding protein in sieve tube exudate. *Planta* 151: 531-534
- Moriyama, Y., Okamoto, H. und Asai, H.** (1999) Rubber-like elasticity and volume changes in the isolated Spasmoneme of giant *Zoothamnium* sp. under Ca^{2+} -induced contraction. *Biophys. J.* 76: 993-1000

- Mrazek, A.** (1910) Über geformte eiweißartige Inhaltskörper bei den Leguminosen. Österr. Bot. Z. 60: 198-201
- Münch, E.** (1930) Die Stoffbewegung in der Pflanze. (Fischer: Jena)
- Muranyi, A. und Finn, B.E.** (2001) Calcium and its enzymes. In: Bertini, I.; Sigel, A. und Sigel H. (Eds.) Handbook on Metalloproteins (Mercel Dekker, Inc.: New York, Basel, 100-115)
- Nakayama, S. und Kretsinger, H.** (1994) Evolution of the EF-hand family of proteins. Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 23: 473-507
- Nalefski, E.A. und Falke, J.J.** (1996) The C2 domain calcium-binding motif: structural and functional diversity. Prot. Sci. 5: 2375-2390
- Ochiai, T., Asai, H. und Fukui, K.** (1979) Hysteresis of contraction-extension cycle of glycerinated *Vorticella*. J. Protozool. 26: 420-425
- Palevitz, B.A. und Newcomb, E.H.** (1971) The ultrastructure and development of tubular and crystalline P-protein in the sieve elements of certain papilionaceous legumes. Protoplasma 72: 399-426
- Parthasarathy, M.V.** (1975) In: Zimmermann, M.H. und Milburn, J.A. (Eds.) Transport in plants. I. Phloem transport. (Encycl. Plant Physiol. 1, Springer-Verlag: Berlin, 3-38)
- Parthasarathy, M.V. und Mühlethaler, K.** (1969) Ultrastructure of protein tubules in differentiating sieve elements. Cytobiol. 7: 17-36
- Pickard, W.F., Knoblauch, M., Peters, W.S. und Shen, A. Q.** (2005) Prospective energy densities in the forisome, a new smart material. Mat. Sci. Eng.: in press
- Poovaiah, B.W. und Reddy, A.S.N.** (1993) Calcium and signal transduction in plants. Crit. Rev. Plant Sci. 12: 185-211
- Raven, J.A.** (1991) Long-term functioning of enucleate sieve elements – possible mechanisms of damage avoidance and damage repair. Plant Cell Environ. 14: 139-146

- Rizo, J. und Südhof, T.C.** (1998) C₂-domains, structure and function of a universal Ca²⁺-binding domain. *J. Biol. Chem.* 273: 15879-15882
- Roberts, T. und Stewart, M.** (2000) Acting like actin: The dynamics of the nematode major sperm protein (MSP) cytoskeleton indicate a push-pull mechanism for amoeboid cell motility. *J. Cell Biol.* 149: 7-12
- Sabnis, D.D. und Hart, J.W.** (1973) P-protein in sieve elements. I. Ultrastructure after treatment with vinblastine and colchicine. *Planta* 109: 127-133
- Sabnis, D.D. und Sabnis, H.M.** (1995) Phloem proteins: structure, biochemistry and function. In: Iqbal, M. (Ed.) *The Cambial Derivatives*. (Encyclopedia of Plant Anatomy, Vol. 9, Berlin: Borntraeger, 271-292)
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T.** (1989) *Molecular cloning – a laboratory manual*. (Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory)
- Sanger, F., Nickler, S. und Coulson, A. R.** (1977) DNA sequencing with chain termination inhibitors. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 74: 5463-5467
- Seaton, B.A. und Dedman J.R.** (1998) Annexins. *BioMetals* 11: 399-404
- Siebert, P.D., Chenchik, A., Kellogg, D.E., Lukyanov, K.A. und Lukyanov, S.A.** (1995) An improved method for walking in uncloned genomic DNA. *Nucl. Acids Res.* 23: 1087-1088
- Smith, O.P., Johnson, K.S.** (1988) Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathion-S-transferase. *Gene* 67: 31-40
- Salisbury, J.L.** (1995) Centrin, centrosomes and mitotic spindle poles. *Curr. Opin. Cell Biol.* 7: 39-45
- Schobert, C., Großmann, P., Gottschalk, M., Komor, E., Pecsvaradi, A. und zur Nieden, U.** (1995) Sieve tube exudate from *Ricinus communis* L. seedlings contains ubiquitin and chaperones. *Planta* 196: 205-210
- Sjolund, R.D.** (1997) The phloem sieve element: a river runs through it. *Plant Cell* 9: 1137-1146

- Sjolund, R.D. und Shih, C.Y.** (1983) Freeze-fracture analysis of phloem structure in plant tissue cultures. I. The sieve element reticulum. *J. Ultrastruct. Res.* 82: 111-121
- Strasburger, E.** (1891) Über den Bau und die Verrichtungen der Leitungsbahnen in den Pflanzen. *Histologische Beiträge, Heft III.* (Fischer: Jena)
- Studier, F.W., Rosenberg, A.H., Dunn, J.J. und Dubendorff, J. W.** (1986) Use of T7 polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol.* 185: 60-89
- Suzuki, K., Doi, T., Imanishi, T., Kodama, T. und Tanaka, T.** (1997) The conformation of the α -helical coiled coil domain of macrophage scavenger receptor is pH dependent. *Biochemistry* 36: 15140-15146
- Swairjo, M.A. und Seation, B.A.** (1994) Annexin structure and membrane interactions : a molecular perspective. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 23: 193-213
- Szilak, L. Moitra, J. und Vinson, C.** (1997) Design of a leucine zipper coiled coil stabilized 1,4 kcal mol⁻¹ by phosphorylation of a serine in the e position. *Protein Sci.* 6: 1273-1283
- Tacke, E., Schmitz, J., Prüfer, D. und Rohde, W.** (1993). Mutational analysis of the nucleic acidbinding 17 kDa phosphoprotein of potato leafroll luteovirus indentifies an amphipathic α -helix as the domain for protein/protein interactions. *Virology* 197: 274-282
- Thompson, G.A.** (1999) P-Protein trafficking through plasmodesmata. In: van Bel, A.J.E. and van Kesteren, W.J.P. (Eds.) *Plasmodesmata: Structure, Function, Role in Cell Communication.* (Springer: Berlin, Heidelberg, New York, 295-313)
- Töpfer, R., Pröls, M., Schell, J., Steinbiss, H.H.** (1987) Transient gene expression in tobacco protoplasts: II: comparison of the reporter gene systems for CAT, NPT II and GUS. *Plant Cell Rep.* 7: 225-228
- van Bel, A.J.E. und Kempers R.** (1996) The pore/plasmodesm unit; key element in the interplay between sieve element and companion cell. *Prog. Bot.* 58: 278-291
- van Bel, A.J.E. und Hess, P.** (2003) Phloemtransport Kollektiver Kraftakt zweier Exzentriker. *Biologie in unserer Zeit* 4: 220-230

- Weis, W.I.** (1996) Structural basis of lectin-carbohydrate recognition. *Annu. Rev. Biochem.* 65: 441-473
- Wergin, W.P. und Newcomb, E.H.** (1970) Formation and dispersal of crystalline P-protein in sieve elements of soybean (*Glycine max* L.). *Protoplasma* 71: 365-388
- Wergin, W.P., Palevitz, B.A. und Newcomb, E.H.** (1975) Structure and development of P-protein in phloem parenchyma and companion cells of legumes. *Tissue and Cell* 7: 227
- Wolf, E., Kim, P.S., Berger, B.** (1997) MultiCoil: a program for predicting two- and three-stranded coiled coils. *Prot. Sci.* 6: 1179-1189
- Zee, S.-Y.** (1969) Fine structure of the differentiating sieve elements of *Vicia faba*. *Aust. J. Bot.* 17: 441-456

Teile dieser Arbeit sind zur Veröffentlichung eingereicht:

Noll, G.A., Knoblauch, M., Fontanellaz, M.E., Ashoub, A., van Bel, A.J.E., Fischer, R. und Prüfer, D. A novel gene family encoding the forisomes of fabaceae.

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. A.J.E. van Bel für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die ständige Diskussionsbereitschaft recht herzlich bedanken.

Ganz besonders möchte ich mich bei Herrn Dr. M. Knoblauch für die Betreuung dieser Arbeit bedanken. Erst die unzähligen Diskussionen, die Denkanstöße, die hilfreiche Unterstützung im Umgang mit scheinbar unlösbaren Problemen und die darauf folgenden erneuten Diskussionen ermöglichten die Erstellung dieser Arbeit.

Bei Herrn Prof. Dr. A. Pingoud bedanke ich mich für die Übernahme des Zweitgutachten.

Bei der gesamten Arbeitsgruppe van Bel möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit und das freundliche Arbeitsklima bedanken. Frau I. Schneider-Hüther danke ich für die praktische Unterstützung im Labor und die permanente Hilfsbereitschaft, auch in hektischen Stunden. Frau Dr. K. Ehlers danke ich für die wertvollen Hinweise und Diskussion bezüglich dieser Arbeit und die weiterführenden Ratschläge.

Dem Kooperationspartner Fraunhofer IME danke ich für die Möglichkeit, Teile der praktischen Arbeit am Fraunhofer Institut in Schmallenberg durchführen zu können. An dieser Stelle möchte ich Frau C. Fischer ganz herzlich für ihre tatkräftige Unterstützung, besonders in der Endphase dieser Arbeit danken. Bei Herrn M. Strauss möchte ich mich ebenfalls für die Unterstützung und gute Zusammenarbeit bedanken.

Herrn Dr. D. Schumann danke ich für die Möglichkeit eines Forschungsaufenthaltes am Genome Research Institute in Cincinnati.

Des Weiteren bedanke ich mich bei Herrn Dr. J. Muth für all die zahlreichen Sequenzierungen.

Ein ganz spezielles „Danke Schön“ gilt Herrn P. Hess, der mir eindrucksvoll bewiesen hat, dass eine Freundschaft am Arbeitsplatz (und natürlich auch an anderen Orten) wertvoller ist, als alles andere. Paul – ich danke dir für all die schönen Kaffeepausen, besonders für die

erbaulichen Gespräche im Botanischen Garten und die pausenlosen Erhellungen meines Gemütszustandes!

Sehr herzlich bedanke ich mich bei Herrn A. Hajenski für die jahrelange Unterstützung, für die bereitwillige Aufnahme jeder kleinsten Neuigkeit über und um das Forisom herum, für die sorgfältige Korrektur dieser Arbeit und für sehr, sehr viel mehr.

Für die unglaubliche Geduld bei jeder meiner „oh Gott, oh Gott – ich schaff das nie“-Anfälle, für die vielen Stunden der theoretischen Auseinandersetzungen zu diesem Thema und für die bereitwillige Unterstützung in jeder Lebenslage möchte ich mich bei Herrn D. Prüfer von ganzem Herzen bedanken.

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Promotionsarbeit selbstständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit (einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen), die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, im jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe. Weiterhin versichere ich, dass die Arbeit noch keiner anderen Fakultät zur Prüfung vorgelegt wurde. Die Bestimmungen der Prüfungsordnung sind mir bekannt.

Gießen, den 4. Oktober 2005

Gundula Noll